Tübingen 1981.

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor : Professor Dr. H. D. Waller

Radioimmunologische Reninbestimmung im menschlichen Nierengewebe. Methodische und diagnostische Studien.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität

vorgelegt von
Berndt Wowra
aus Landsberg am Lech

1981

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. D. Waller

Radioimmunologische Reninbestimmung im menschlichen Nierengewebe. Methodische und diagnostische Studien.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität

vorgelegt von
Berndt Wowra
aus Landsberg am Lech
1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. G. Rassner
1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Hayduk
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Heller

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	1
1.2.	Fragestellung	4
2.	Methodik	4
2.1.	Charakterisierung der Gesamtmethode	4
2.2.	Radioimmunoassay (RIA)	5
2.2.1.	Geschichte und Bedeutung des RIA	5
2.2.2.	Material für den RIA	5
2.2.3.	Prinzip des RIA	6
2.3.	Berechnung und Einheiten der Reninkonzentration	7
2.4.	Reninextraktion aus dem Nierengewebe	8
2.4.1.	Doppelhomogenisation des Gewebes	8
2.4.2.	Resuspension des ersten Sedimentes	8
2.4.3.	Reninausbeute im direkten Gewebehomogenisat	8
2.4.4.	Ultraschallbehandlung verschiedener Gewebefraktionen	8
2.5.	Renin-Substrat-Reaktion	9
2.5.1.	Abhängigkeit der enzymatischen Angiotensinbildung vom Substratgehalt des Inkubationsansatzes	9
2.5.2.	Bestimmung der MICHAELIS-Konstante (K_m)	10
2.5.3.	Abhängigkeit der Reninwerte von der Gewebeverdünnung	10
2.5.4.	Definition der spezifischen Gewebekonzentration	11
2.6.	Behandlung der Proben nach der Inkubation	11
2.7.	Proteinbestimmung und spezifische Reninkonzentration	12
2.7.1.	Bedeutung der spezifischen Reninkonzentration	12
2.7.2.	Quelle der Proteinbestimmung	12
2.7.3.	Materialien für die Proteinbestimmung	13
2.7.4.	Methode der Proteinbestimmung	13
2.8.	Reninbestimmung im menschlichen Nierengewebe	14
2.8.1.	Material für Gewebeaufarbeitung und Inkubation	14
2.8.2.	Gewebeaufarbeitung	14
2.8.3.	Inkubationsverfahren	16
2.8.4.	Wiederfindung von Angiotensin I	17
2.9.	Biologische Reninbestimmung (BIO)	18
2.10.	Differentialzentrifugation	18
2.10.1.	Geräte und Material für die Ultrazentrifugation	18

2.10.2. Differentialzentrifugation des Nierengewebes 19
3. Ergebnisse 21
3.1. Radioimmunoassay 21
3.1.1. Qualitätsprüfung des RIA 21
3.1.2. Einfluß des Nierenleerwertes auf die Reninbestimmung im RIA 21
3.2. Reninextraktion aus dem Nierengewebe 22
3.2.1. Doppelhomogenisation des Gewebes 22
3.2.2. Resuspension des ersten Sedimentes 22
3.2.3. Reninmenge im Gewebehomogenisat 24
3.2.4. Ultraschallbehandlung verschiedener Gewebefraktionen 24
3.3. Renin-Substrat-Reaktion 25
3.3.1. Abhängigkeit der enzymatischen AI-Bildung vom Substratgehalt des Inkubationsmediums 25
3.3.2. MICHAELIS-Konstante und optimale Substratkonzentration 28
3.3.3. Reninwerte in Abhängigkeit von der Gewebeverdünnung 28
3.3.4. Mittlere Gewebekonzentration 30
3.3.5. Interferenz von endogenem Substrat 31
3.3.6. Reninreaktion im Inkubationsmedium bei 4°C 31
3.4. Behandlung der Proben nach der Inkubation 31
3.5. Reproduzierbarkeit der Gesamtmethode 33
3.5.1. Qualität der Proteinbestimmung 33
3.5.2. Mehrfachbestimmungen einer Probe 33
3.5.3. Wiederfindung von Angiotensin I 34
3.6. Vergleich zwischen biologischer und radioimmunologischer Reninbestimmung im Nierengewebe 34
3.6.1. Zielsetzung 34
3.6.2. Ergebnisse des Vergleichs 34
3.7. Ergebnisse der Differentialzentrifugation 36
3.7.1. Vorbemerkungen 36
3.7.2. Subzelluläre Verteilung der Reninkonzentrationen nach vollständiger und schonender Homogenisation 36
3.7.3. Subzelluläre Verteilungsmuster der Reninkonzentrationen 37
3.8. Krankheitsbilder und Reninkonzentration im Nierengewebe 39
3.8.1. Patienten 39
3.8.2. "Normalwerte" für Renin im Nierengewebe 39
3.8.3. Reninwerte bei besonderen Diagnosen 45

3.8.4. Schwankung der Reninverteilung im Nierengewebe 46
4. Diskussion 47
4.1. Radioimmunologische AI-Bestimmung 47
4.2. Gewebeaufarbeitung und Inkubation 48
4.3. Vergleich zwischen Bioassay und Radioimmunoassay 50
4.4. Differentialzentrifugation 52
4.5. Reninkonzentrationen bei verschiedenen Erkrankungen 53
5. Zusammenfassung 55
Literaturverzeichnis 57

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AI	Angiotensin I
AII	Angiotensin II
ANV	Akutes Nierenversagen
BIO	Biologische Reninbestimmung, Bioassay
c	Zona corticalis (in Tabellen)
cm	Zona corticomedullaris (in Tabellen)
EW	Eiweiß
K_m	MICHAELIS-Konstante
NG	Nierengewebe
r	Korrelationskoeffizient
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunoassay, radioimmunologische Reninbestimmung
v	Variationskoeffizient
V_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit im Inkubationsmedium

Die Abkürzungen werden bei ihrem ersten Auftreten im Text nochmals erklärt.

1. Einleitung

1.1. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Die Regulation von Blutdruck, extrazellulärem Flüssigkeitsvolumen und Elektrolytausscheidung des Körpers erfolgt durch das RAAS, das damit eine wichtige Rolle bei physiologischen Vorgängen und pathologischen Veränderungen des Organismus spielt.

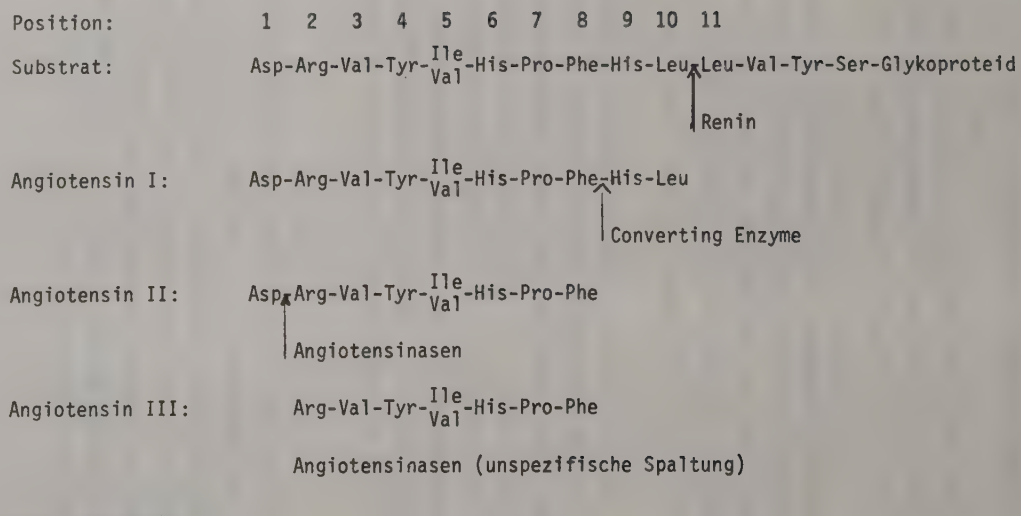
Renin (EC 3.4.99.19) wird in den granulierten, myoepithelialen (juxtaglomerularen) Zellen in der Wand der afferenten Arteriole nahe dem Glomerulus synthetisiert und gespeichert (41, 48, 54, 71, 72).

Die Reninsekretion als ein aktiver, Energie verbrauchender Prozess (16, 18) wird von vielen Faktoren beeinflußt (Obersicht: 7, 48, 74; außerdem: 1, 16, 28, 35, 38, 51, 58, 67, 68, 73, 102, 103, 104, 111). Der genaue Regulationsmechanismus der Reninsekretion ist aber noch unklar (48, 51, 71).

Das in das Blut sezernierte Renin spaltet das spezifische alpha(2)-Globulin Angiotensinogen (Reninsubstrat) unter Bildung des Dekapeptides Angiotensin I (AI); dieses wird vor allem in den Lungengefäßen durch die Dipeptidyl-Hydrolase Converting Enzyme (EC 3.4.15.1), von dem kürzlich Isoenzyme beschrieben wurden (10, 11, 12), durch Abspaltung von zwei Aminosäuren zum Angiotensin II (AII) abgebaut, das die eigentliche Wirksubstanz des Systems darstellt. Unspezifische Peptidasen (Angiotensinasen) bauen es zum Heptapeptid (AIII) und inaktiven Peptiden ab (s. Abb. 1).

Renin als ein hochmolekulares Protein weist speziesunterschiedlich verschiedene molekulare Strukturen auf (3, 14, 25, 26, 59, 76, 92, 93, 96, 104, 107). Menschliches Renin wurde bisher in drei Formen mit den Molekulargewichten von 43 000, 60 000 und 150 000 Dalton nachgewiesen (86). Außerdem soll es weitere Formen mit noch unbekanntem Molekulargewicht geben. Die physiologische Aufgabe der verschiedenen Renine und ihre Bedeutung bei pathologischen Prozessen ist zur Zeit noch unklar.

Abbildung 1: Abbau des Angiotensinogens



Schema nach: BRAVO et al. (17), GOODFRIEND and PEACH (39), KOKOT (54) und SKEGGS et al. (97).
Die Pfeile bezeichnen die enzymatischen Spaltungen der Proteinmoleküle.

EGGENA und Mitarbeiter (29) haben drei Varianten menschlichen Angiotensinogens im Plasma von Frauen nach Östrogentherapie entdeckt. In vitro spaltet menschliches Renin das Angiotensinogen von fast allen Tierspezies (82) und verschiedene synthetische Derivate (6, 62, 78, 97). Da das biologisch wenig aktive Produkt der Reninreaktion (7, 37, 81), Angiotensin I, mit Ausnahme des gegenseitigen Austausches von Valin und Isoleucin in Position 5 bei den verschiedenen Spezies gleich ist, nimmt man an, daß der abgespaltene Rest des Substratmoleküls für die Speziesspezifität verantwortlich ist (82) (s. Abbildung 1, Seite 2).

Die wesentlichen Wirkungen des RAAS werden durch Angiotensin II vermittelt: Blutdrucksteigerung durch direkte Wirkung an der Gefäßwandmuskulatur (Vasokonstriktion) und indirekt durch Wirkung an sympathischen Nerven und am Nebenierenmark (Katecholaminfreisetzung); weitere Wirkmechanismen: positive Inotropie am Myokard, Stimulierung der Aldosteronfreisetzung aus der zona glomerulosa der Nebenniere und dadurch Steigerung der Natriumrückresorption im distalen Teil des Nephrons, Steigerung der Uterusmotilität. Darüberhinaus hemmt AII die Reninfreisetzung aus der Niere im Sinne einer Rückkoppelung (negativer feed back).

Wird in Position 1 aus dem Angiotensin II Asparaginsäure abgespalten, entsteht Angiotensin III, das von SEMPLE und MORTON (94) im menschlichen Plasma entdeckt wurde (s. Abbildung 1). Es bewirkt kaum eine Blutdrucksteigerung, vermittelt aber die Aldosteronsekretion (17, 39).

Neben renalem und plasmatischem Renin kann man in verschiedenen Geweben Komponenten des Reninsystems nachweisen (21, 28, 36, 48), jedoch sind in der Niere quantitativ die bedeutensten Reninmengen vorhanden (45, 48).

Der renale Reningehalt ist zur Granulation der juxtaglomerularen Zellen positiv korreliert (48, 72, 87). Im Regelkreis des RAAS stellt die Reninkonzentration postmortal entnommener Nieren bzw. von Nieren nephrektomierter Patienten eine weitgehend statische Größe dar, aus der besonders bei chronischen Erkrankungen (48) Rückschlüsse auf die Pathogenese gezogen werden können.

Weiterführende Übersichten finden sich in folgenden Arbeiten: 7, 37, 48, 54, 63, 65, 81.

1.2. Fragestellung

A) Es sollte eine Methode zur Reninbestimmung im menschlichen Nierengewebe entwickelt werden, die qualitativ der BOUCHER'schen Mikromethode (12) in der Modifikation nach KRAUSE und Mitarbeitern (43) gleichwertig ist, die aber einfacher und weniger zeitraubend ist als der Tierversuch. Die Einführung eines Radioimmunoassay zur Bestimmung von Angiotensin I bot die Möglichkeit, eine große Probenzahl bei hoher Empfindlichkeit der Methode zu bestimmen.
B) Ein direkter Vergleich identischer Proben, die biologisch und radioimmunologisch bestimmt wurden, sollte methodische Unterschiede verdeutlichen.
C) Differentialzentrifugation von Nierenhomogenisaten zeigte die subzelluläre Verteilung der Reninkonzentration im menschlichen Nierengewebe, hob die Bedeutung der Bezugsgröße für die Renineinheit (Nierengewicht oder Proteingehalt) hervor und wies auf Unterschiede zu Tierspezies hin. Außerdem wurde der Versuch unternommen, eine granuläre Reninfraktion für spätere Experimente anzureichern.
D) In weiterer Anwendung der Methode wurden Reninwerte im Nierengewebe gewonnen, bei unterschiedlichen Diagnosen Normalwerten gegenüber gestellt und lokale Schwankungen der Reninverteilung im Nierengewebe untersucht.

2. Methodik

2.1. Charakterisierung der Gesamtmethode

Nierengewebsproben aus Nierenrinde und -mark wurden homogenisiert und zentrifugiert. Das in Oberstand und Sediment enthaltene Renin wurde in Gegenwart von Schafsangiotensinogen eine Stunde bei 37°C und pH 7.4 inkubiert; das dabei aus dem Substrat durch Renin abgespaltene Angiotensin I wurde im Radioimmunoassay quantitativ bestimmt. Unter Berücksichtigung des Proteingehaltes bzw. der verarbeiteten Gewebemenge konnte die spezifische und die absolute Reninkonzentration der Niere errechnet werden.
Im folgenden Teil werden die einzelnen methodischen Schritte dargestellt und analysiert, um daraus eine Routinemethode abzuleiten, die unter

Punkt 2.8. auf Seite 14 vorgestellt wird.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Student t-Test für gepaarte oder ungepaarte Beobachtungen (20).

2.2. Radioimmunoassay (RIA)

2.2.1. Geschichte und Bedeutung des RIA

Im Jahr 1960 berichteten YALOW und BERSON (110) über eine Methode zur Messung von Insulin im menschlichen Plasma mit der neuen Technik der kompetitiven Bindungsanalyse. Etwa zur gleichen Zeit entwickelte EKINS (30) eine ähnliche Methode zur Bestimmung der Plasmakonzentration von Thyroxin. Seit damals wurde keine andere Technik zur direkten Bestimmung von Eiweißhormonen und ähnlichen Substanzen so häufig angewendet wie der RIA. Ein großer Teil des Fortschrittes in der Endokrinologie in den letzten Jahren war nur damit möglich (75). HABER und Mitarbeiter (46) beschrieben 1969 einen RIA zur Messung der Plasmareninaktivität, auf dem sich der kommerzielle Kit begründet, der hier verwendet wurde (90).

2.2.2. Material für den RIA

a) Der Reagenziensatz enthielt folgende Bestandteile:

1) (Asp^1, Ile^5)-Angiotensin I (^{125}J), lyophilisiert mit Lysozym; es wurde in 0.1M Tris-Acetat-Puffer pH 7.4 aufgelöst und besaß dann eine spezifische Aktivität von 8.7×10^{-2} µCi/ml.
2) Angiotensin I-Antiserum vom Kaninchen, lyophilisiert mit Lysozym; es wurde in Tris-Puffer (0.1M, pH 7.4) gelöst in einer Konzentration, daß sich eine B_0-Bindung (Anteil der Bindung von ^{125}J-AI an den Antikörper) von 60 $\pm$ 15 % ergab.
3) (Asp^1, Ile^5)-Angiotensin I-Standard (mit lyophilisiertem Lysozym), aufzulösen wie 1) und 2).
4) Tris-Acetat-Puffer, 0.1M, pH 7.4 $\pm$ 0.05, 0.1 % Lysozym, der das Medium für die Probenbestimmung lieferte.
5) Dextran-Aktivkohle (mit Phosphat), die in aqua bidestillata suspendiert wurde (1.75 g / 100 ml).

b) Geräte:

1) Polystyrolgefäße der Firma W.Sarstedt, Nürnberg; darin wurden die RIA-Proben fertiggestellt.
2) Eppendorf^{R}-Pipetten.
3) Zur Messung der Impulsraten wurde verwendet ein
   - GAMMASZINT BF 5300[a], oder ein
   - MR 1032 GAMMA COUNTING SYSTEM[a]
4) Ein HEWLETT PACKARD 9810 A CALCULATOR diente der Berechnung der Regressionsgerade aus der Standardverdünnung.

c) Der Nierenleerwert (9): Nierengewebe wurde eine Stunde bei 4°C im Inkubationsansatz ohne Substrat inkubiert und wie üblich weiterverarbeitet. Er sollte ein Gewebeäquivalent in den nicht inkubierten RIA-Proben d.h. der Standardverdünnungsreihe darstellen.

2.2.3. Prinzip des RIA

Die radiochemische Reaktion im RIA beruht auf der Kompetition radioaktiv markierter und unmarkierter Antigene um ihren spezifischen Antikörper. Natürliches in seiner Menge unbekanntes Antigen (AI) wird in einem geeigneten Puffer mit einer konstanten Menge ^{125}J-AI (synthetisches Antigen) gemischt. Dazu gibt man eine konstante Menge Antikörper. Dieser liegt nur in begrenztem Umfang vor und reagiert deshalb quantitativ den zugegebenen Antigenkonzentrationen entsprechend mit markiertem und nicht markiertem Angiotensin I. Die an den Antikörper gebundene Aktivität einer Probe ist also umgekehrt proportional der Konzentration von unmarkiertem, natürlichem AI (8, 90). Nach 18 bis 24 Stunden hat sich im Puffermedium ein Gleichgewicht eingestellt, und das freie Angiotensin wird vom antikörpergebundenen Anteil durch Adsorption an Aktivkohle und anschließende Zentrifugation getrennt. Die Aktivität des Überstandes wird ausgezählt, und an Hand der Probenaktivität einer Standard-AI-Verdünnung kann man die Angiotensinmenge in unbekannten Proben errechnen.

---

[a] Aus der Isotopenabteilung der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen (Prof. Dr. E. KALLEE).

2.3. Berechnung und Einheiten der Reninkonzentration

Die gemittelten Impulsraten (Doppel- und Dreifachproben) werden in prozentualer Abhängigkeit von der Impulsrate der Bindungskapazität des Antikörpers (diese Proben enthalten kein unmarkiertes AI) errechnet. Da die gebundene Aktivität einer Probe umgekehrt proportional der AI-Konzentration ist (8, 90), entspricht der Kehrwert davon dem y-Wert in der Regressionsgerade aus der Standardverdünnung. Als "x" errechnet sich aus der Geradengleichung ($y = ax + b$) der AI-Gehalt im RIA-Röhrchen einer unbekannten Probe. Multipliziert man diesen Wert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor, erhält man die Reninkonzentration der Probe. Für die auf das Feuchtgewicht der Niere bezogene absolute Renineinheit läßt sich der Verdünnungsfaktor berechnen aus

a) der abgewogenen Gewebemenge,
b) dem Flüssigkeitsvolumen, in dem die Probe aufgearbeitet wurde,
c) dem Volumen des Inkubationsansatzes, und
d) dem im RIA verwendeten Teil des Inkubationsansatzes.

Zur Berechnung der spezifischen Reninkonzentration setzt sich der Verdünnungsfaktor zusammen aus

a) der Gewebekonzentration in der Lösung, in der der Proteingehalt gemessen wurde,
b) der weiteren Verdünnung der Probe vor der Inkubation,
c) und d) wie oben.

Man erhält als Renineinheiten:

a) die absolute Reninkonzentration

$$/^{ug\ AI\ /\ g_{NG}\cdot h}$$

Mikrogramm Angiotensin I (-Produktion) pro Gramm Nierengewebe und Stunde Inkubation, und

b) die spezifische Reninkonzentration

$$mg\ AI\ /\ g_{EW}\cdot h$$

Milligramm Angiotensin I pro Gramm Eiweiß des Nierengewebes und pro Stunde Inkubation.

Aus dem Quotienten beider Einheiten gewinnt man den gewichtsbezogenen Proteingehalt des Nierengewebes (Einheit: mg_{EW}/g_{NG}).

2.4. Reninextraktion aus dem Nierengewebe

2.4.1. Doppelhomogenisation des Gewebes

Das Nierengewebe wurde nach der Entnahme homogenisiert und bei 4°C 15 Minuten mit 2700 g zentrifugiert. Um, wie von ORTH et al. (79) beschrieben, den Anteil des sich im Überstand befindlichen Renin weiter zu erhöhen, wurde das Sediment nochmals homogenisiert und abzentrifugiert. Es wurden folgende drei Probengruppen verglichen:

Gruppe A: Oberstand nach einmaliger Aufarbeitung,

Gruppe B: Beide Oberstände wurden vereinigt und bestimmt (Gesamtrenin),

Gruppe C: Zweiter Oberstand nach Homogenisation und Zentrifugation des primären Sedimentes.

(Der Vergleich erfolgte an aliquoten, identischen Proben).

2.4.2. Resuspension des ersten Sedimentes

Hier wurde das erste Sediment nicht nochmals homogenisiert, sondern lediglich mit einem Plastikspatel, einem Vortex^{R}-Mixer und, durch eine Kanüle (Nr. 17) gezogen, resuspendiert. Die übrige Behandlung und die Bezeichnung der Probengruppen blieb unverändert wie oben.

2.4.3. Reninausbeute im direkten Gewebehomogenisat

Ein Aliquot der Gewebeprobe wurde homogenisiert und verdünnt direkt bestimmt. Als Vergleich dienten die vereinigten Oberstände (nach Resuspension des ersten Sedimentes) einer Parallelprobe.

2.4.4. Ultraschallbehandlung verschiedener Gewebefraktionen

Zur Beantwortung der Frage, ob sich durch Ultraschallbehandlung die Reninausbeute steigern läßt, wurden Fraktionen der Gewebeaufarbeitung in zwei Energiestufen (10 W und 35 W) jeweils 20 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Aliquote ohne Behandlung dienten als Vergleich. Die

untersuchten Fraktionen sind das Nierenhomogenisat, das resuspendierte, primäre Sediment (nach 2700 g-Zentrifugation) und das resuspendierte Sediment nach 80000 g-Zentrifugation (s. S. 19)[a].

2.5. Renin-Substrat-Reaktion

Vorbemerkungen:
Zahlreiche Arbeiten liegen über die Reaktionskinetik zwischen Renin und Substrat verschiedener Spezies vor (24, 32, 84). Um unbekannte Reninaktivitäten bestimmen zu können, muß im Inkubationsmedium Substratsättigung vorliegen. Dies ist der Fall, wenn die Substratkonzentration das 7.5- (50) bis 10fache (79) der MICHAELIS-Konstante (K_m) beträgt.

2.5.1. Abhängigkeit der enzymatischen Angiotensinbildung vom Substratgehalt des Inkubationsansatzes

Der Gesamtzusammenhang wurde in vier Teilversuchen (V1 - V4) untersucht (s. Tabelle 1). Die Gewebeprobe in Versuch V4 wurde in zwei Verdünnungen (V4A und V4B) gemessen, wobei das Gewebe in Versuch V4B doppelt so stark verdünnt wurde wie in Versuch V4A. Innerhalb eines Teilversuches wurden stets Aliquote einer Gewebeprobe mit steigenden Substratkonzentrationen inkubiert und wie üblich bestimmt.

---

[a] Es wurde das Gerät SONIFIER^R B-12 POWER SUPPLY der Firma BRANSON SONIC POWER Company, Danburg Conneticut verwendet, das PD Dr. H. HILLER (Abt. Inn. Med. II, Med. Univ. Klinik, Tübingen; Direktor: Prof. Dr. H.D. WALLER) zur Verfügung stellte.

Tabelle 1: Merkmale der Teilversuche V1 bis V4.

Versuch	Niere Nr.	n	G	S
V1	19 c/cm	3	4.70	1.3 - 100.0
V2	19 c/cm	2	3.10	8.8 - 40.0
V3	19 c	3	2.52	10.0 - 100.0
V4A	10 c re.	1-3	0.14	1.6 - 100.0
V4B	10 c re.	1-4	0.07	1.6 - 100.0

Niere Nr.: s. Tabelle 16, Seite 40/41.
G: Gewebekonzentration (mg Feuchtgewicht/ ml);
S: Substratkonzentration (mg Substratprotein/ml);
V4A: Versuch V4, Verdünnung A;
V4B: Versuch V4, Verdünnung B;
re.: rechte Niere.

2.5.2. Bestimmung der MICHAELIS-Konstante (K_m)

Neben der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) wurde die MICHAELIS-Konstante ermittelt. Sie wird als Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit definiert und stellt ein Maß für die Affinität des Renin zum Substrat dar (52). Sie entspricht der Steigung im ansteigenden Teil einer reaktionskinetischen Darstellung, wobei sie umso kleiner ist, je steiler die Kurve ansteigt, und je größer damit die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat ist. Die K_m kann graphisch mit einem LINEWEAVER-BURK-Diagramm bestimmt, oder durch eine Regressionsgerade errechnet werden. Dabei werden die reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeit im ansteigenden Kurvenast bis V_{max} gegen die reziproken Substratkonzentrationen aufgetragen.

2.5.3. Abhängigkeit der Reninwerte von der Gewebeverdünnung

Manche Autoren beschreiben einen positiven Effekt der Verdünnung des Renin/Substrat-Gemisches auf die Reninaktivität (23, 45, 65, 79).
Es wurden deshalb die Reninwerte aus den Versuchen V4A und V4B unter diesem Gesichtspunkt ausgewertet, und dann drei Nierenproben (Niere Nr. 18 c, 19 c, 27 c) bei drei Substratkonzentrationen mit steigender

Gewebekonzentration (d.h. mit abnehmender Gewebeverdünnung) inkubiert.

2.5.4. Definition der spezifischen Gewebekonzentration

Die spezifische Gewebekonzentration bezeichnete die Menge Nierengewebe (Milligramm) pro Milliliter Flüssigkeit, in der das Gewebe vor der Inkubation aufgearbeitet wurde.

Von dieser Konzentration wurden 50 µl im Inkubationsansatz inkubiert (s. Abbildung 3, Seite 17). Ihr Betrag diente der Abschätzung, ob das Nierengewebe für die Reninbestimmung in geeigneter Verdünnung vorlag. Dadurch konnte die Bestimmung von mehreren aliquoten einer Probe in unterschiedlicher Verdünnung vermieden und Arbeits- und Materialaufwand gespart werden. Die Gewebekonzentration sollte im Bereich des auf Seite 30 beschriebenen Plateau's liegen (s. Abbildung 6, Seite 30).

Bei besonderen Fraktionen (z. B. Sediment nach 80000 g-Zentrifugation) wurde Gewebe jedoch in wesentlich höherer Konzentration inkubiert, da die Errechnung der Gewebekonzentration in solchen Fällen nicht berücksichtigte, daß ein wesentlicher Teil der Probe bereits bei der Aufarbeitung abgetrennt wurde (s. Abbildung 4, Seite 20).

Nieren mit der Diagnose "maligne Nephrosklerose", die extrem hohe Reninwerte besaßen, mußten stärker (unter 0.15 mg/ml) verdünnt werden als sogenannte "Normalnieren".

Ebenso gab es wenige Nieren mit sehr niedrigen Reninwerten, bei denen für die Bestimmung der Reninkonzentration eine wesentlich höhere Gewebekonzentration erzielt werden mußte (Beispiele: Niere Nr. 16 und 22; s. Tabelle 16, Seite 40/41).

2.6. Behandlung der Proben nach der Inkubation

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, und um kontrollierte Reaktionsbedingungen im Substratansatz zu gewährleisten, sollte die Reninreaktion nach der Inkubation sofort gestoppt werden. Es wurde untersucht, ob das Renin bei 4°C in seiner Aktivität vollständig blockiert

war. Von neun Nierenproben wurde je ein Aliquot bei 37°C und ein weiteres bei 4°C inkubiert, dessen Reninkonzentration in Prozent von der des 37°C-Aliquotes errechnet wurde. Dann wurde die Reninreaktion im Inkubationsansatz neben der Abkühlung auf 4°C durch Zugabe von 100 µl 1N HCl gestoppt, 15 Minuten bei 95°C abgekocht und anschließend mit 100 µl 1N Natronlauge neutralisiert. Zum Vergleich wurden Ansäuern und Neutralisation, bzw. Abkochen unterlassen und auf alle drei Maßnahmen verzichtet.

Die pH-Werte im Inkubationsmedium änderten sich wie folgt:

Nach Inkubation, vor Säure:	pH = 7.4 ± 0.1;	(n = 4),
nach Säure, vor Abkochen:	pH = 1.2 ± 0.1;	(n = 4),
nach Abkochen, vor Lauge:	pH = 1.2 ± 0.1;	(n = 3),
nach Laugezugabe:	pH = 7.5 ± 0.5;	(n = 4).

2.7. Proteinbestimmung und spezifische Reninkonzentration

2.7.1. Bedeutung der spezifischen Reninkonzentration

Die Lagerung des Nierengewebes führt zu einem Wasserverlust gegenüber frischen Proben; dadurch kommt es bei wiederholten Bestimmungen desselben Gewebes zu immer höheren absoluten Reninwerten. Zur diagnostischen Beurteilung des Reningehaltes ist es jedoch wichtig, eine Bezugsgröße für das Renin zu besitzen, die wie die spezifische Renineinheit unabhängig von Lagerungseinflüssen ist. Da aber auch ein veränderter Wassergehalt Ausdruck eines funktionellen Geschehens (z. B. Ödem) sein kann, ist die gleichzeitige Bestimmung beider Einheiten besonders informativ. Aus dem Quotienten beider Werte läßt sich leicht der Proteingehalt des Gewebes errechnen und damit weitere Information gewinnen.

2.7.2. Quelle der Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung mit dem Phenolreagenz wurde 1951 von LOWRY und seinen Mitarbeitern (64) entwickelt. Als Proteinstandard wurde Labtrol verwendet.

2.7.3. Materialien für die Proteinbestimmung

1) Capilettor^{R} Präzisionskolbenpipetten, Labora, Mannheim;
2) LAB-TROL^{R} Kontrollserum, Merz + Dade, München;
3) Eppendorf - Photometer;
4) FOLIN-CIOCALTEUS Phenolreagenz, Merck Art. 9001;
5) $HClO_4$ conz., Merck Art. 519;
6) Na_2CO_3, Merck Art. 6392;
7) Na-K-Tartrat, Merck Art. 8087;
8) $CuSO_4$, Merck Art. 2790;
9) 0.1N NaOH, Merck Art. 9141.

2.7.4. Methode der Proteinbestimmung

Lösungen:

a) Verdünntes Phenolreagenz: Verdünnung 1:1 mit aqua bidestillata;
b) alkalische Kupfersulfatlösung:
   2 % Na_2CO_3 in 0.1N NaOH.....100 Teile
   1 % $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$.....1 Teil
   2 % Na-K-Tartrat.....1 Teil
c) Labtrol-Standardverdünnung in aqua bidestillata entsprechend einer Proteinkonzentration zwischen 0.01 und 0.1 mg/ml.

In je einem 10 ml-aliquot[a] der aufgearbeiteten Nierenprobe wurde durch Zugabe von 0.6 ml[a] konzentrierter Perchlorsäure Protein gefällt. Die Säurekonzentration der Lösung war damit 0.4N. Nach 30 Minuten wurden die Proben 10 Minuten bei 2700 g zentrifugiert, und das Sediment in 0.2 ml[a] 0.5N Natronlauge gelöst, und nach Ergänzung der Proben von 30 bzw. 50 µl mit 1 ml mit je 5 ml Kupfersulfatlösung gemischt. Nach 10 bis 12 Minuten wurden je 0.5 ml verdünntes Phenolreagenz zugegeben, gut durchmischt und nach 30 Minuten bei 770 nm die Extinktion der Proben gegen einen Leerwert abgelesen; der Leerwert enthielt gegenüber der Probe kein Protein. Dabei lagerten sich im alkalischen Milieu der Lösung Kupferionen an die Proteine an, die das Folinreagenz zu einem

[a]In Einzelfällen auch ein Vielfaches dieser Volumina.

Farbstoff mit definierter Extinktion reduzierten. In gleicher Weise wurden Doppelproben der Standardverdünnung hergestellt, die als Maßstab für den Proteingehalt der unbekannten Proben dienten. Aus den Wertepaaren von Extinktion und Proteingehalt der Standardreihe wurde eine Regressionsgerade errechnet, aus der durch Einsetzen des Extinktionswertes einer unbekannten Probe deren Proteingehalt bestimmt wurde.

2.8. Reninbestimmung im menschlichen Nierengewebe

2.8.1. Material für Gewebeaufarbeitung und Inkubation

A) Geräte:

1) Einmalkanüle Nr. 17 (0.55 X 25 mm), Braun AG, Melsungen;
2) Plastikeinmalspritze, Braun AG, Melsungen;
3) Polyvinyl-Reagenzgefäße (verschiedener Volumina), W.Sarstedt, Nürnberg;
4) PYREX^{R}-Handhomogenisator, Fischer Nr. 7727;
5) UNIVERSAL JUNIOR I KS - Zentrifuge, Heraeus Christ, Osterode;
6) VORTEX^{R}-Mixer.

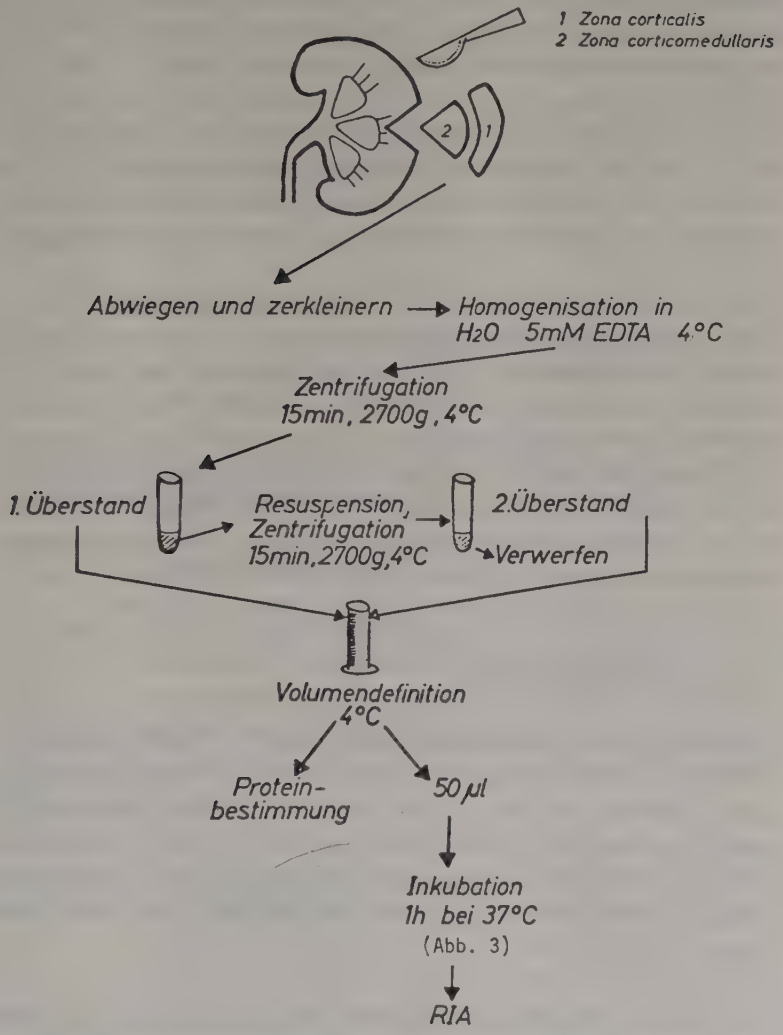
B) Reagenzien:

1) Dimercaprol (BAL) 2 %ige Lösung in Benzylbenzoat, Schwarz/Mann (90);
2) EDTA Titriplex III^{R}, Merck Art. 8418;
3) 8-Hydroxychinolin 0.3M, Schwarz/Mann (90);
4) Natronlauge 1N, Merck Art. 9137;
5) Neomycinsulfat;
6) Salzsäure 1N, Merck Art. 9057;
7) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Merck Art. 8382.

2.8.2.Gewebeaufarbeitung

Die Nieren wurden mindestens dreimal gefroren und aufgetaut. Diese Behandlung sollte die Reninextraktion durch Sprengung der Zellmembranen erleichtern (42, 48, 60). Die Lagerung der Nieren erfolgte bei -20^{o}C unter Luftabschluß. Bei der Probenentnahme wurde von der halbaufgetauten Niere die Kapsel abgezogen und der 1 mm dicke subkapsuläre Anteil entfernt, da er keine Glomerula enthält (65). Dann wurde ein keilförmiger Bezirk makroskopisch unauffälligen Gewebes oder eines

Abbildung 2: Darstellung der Gewebeaufarbeitung



Schrumpfbezirkes herausgeschnitten. Nierenrinde und -mark wurden voneinander getrennt, jede Probe mit der Schere zerkleinert (48) und gewogen. In Einzelfällen wurden auch Nierenbiopsien verarbeitet, so daß die Gewebeproben zwischen 50 mg und 800 mg schwer waren (s. Abb. 2).

Die auf nicht mehr als $4^{o}C$ erwärmte Gewebeprobe wurde sodann manuell in 6 - 8 ml aqua bidestillata 5mM EDTA vollständig homogenisiert, bis keine Partikel mehr zu erkennen waren. Das Homogenisat wurde in vorgekühlten Plastikgefäßen 15 Minuten bei $4^{o}C$ und 2700 g zentrifugiert.

Der (erste) Oberstand wurde bei $4^{o}C$ aufbewahrt, das Sediment mit einem Plastikspatel und einem Vortex-Mixer in 6 - 8 ml aqua bidestillata 5mM EDTA resuspendiert und mit einer Spritze zweimal durch eine Kanüle Nr. 17 gepresst (aspirieren und ausstoßen). Die milchige Gewebesuspension wurde erneut 15 Minuten bei 2700 g und $4^{o}C$ zentrifugiert. Beide Oberstände wurden vereinigt. Diese Gewebefraktion enthielt das gelöste Renin und wurde in aqua bidestillata 5mM EDTA weiterverdünnt, bis die erwünschte Gewebeverdünnung erreicht war. Ein 50 µl-aliquot wurde im Substratansatz inkubiert, eine Parallelprobe wurde benutzt, um die Proteinkonzentration zu messen (s. Abb. 2, Seite 15).

2.8.3. Inkubationsverfahren

In einem Polyvinyl-Reagenzgefäß wurden zu 500 µl Tris-HCl-Puffer mit 17.5 mg Angiotensinogen (s. Abb. 3) bei pH 7.4 50 µl einer Gewebeprobe pipettiert und gemischt. Die Inkubation erfolgte über eine Stunde bei $37^{o}C$ im Wasserbad. Danach wurde die Probe mit 100 µl 1N Salzsäure auf pH 1.2 angesäuert, 10 Minuten im siedenden Wasserbad abgekocht, und nach pH-Korrektur mit 100 µl 1N Natronlauge, wurden 50 µl der Probenlösung im RIA bestimmt.

Das Schafsubstrat wurde aus dem Plasma erwachsener, männlicher Schafe drei Tage nach Nephrektomie gewonnen. Die Anreicherung erfolgte nach der Methode von HAAS et al. (44) und der modifizierten Methode nach BOUCHER et al. (12). Neomycinsulfat sollte bakterielle Ansiedlungen im Reagenzienansatz unterbinden (71, 79). Die Komplexbildner EDTA, 8-Hydroxychinolin und Dimercaprol hemmen die Angiotensinasen und das

Abbildung 3: Substratansatz

500	µl	Tris-HCl-Puffer, pH 7.4	0.002 M
		Neomycinsulfat	0.0003 M
		$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	0.005 M
		Dimercaprol	0.002 M
		8-Hydroxychinolin	0.003 M
		Angiotensinogen (Schaf)	0.0175 g
50	µl	Probe (verdünnt)	
--------		37^oC / 60 Minuten ----------	
100	µl	HCl, 1N	
		kochendes Wasserbad, 10 Minuten	
100	µl	NaOH, 1N	

Converting Enzyme quantitativ (22, 32, 33, 51, 66, 74, 100), ohne die Reninaktivität zu beeinflussen (15, 32).

2.8.4. Wiederfindung von Angiotensin I

Die Wiederfindung von synthetischem Angiotensin I (aus dem Kit für den RIA, 90) nach einstündiger Inkubation mit Nierengewebe bei 37^oC war ein Maß für Angiotensinverluste, die durch Angiotensinasenaktivität verursacht wurden. Zur Unterbindung der Reninreaktion wurde in allen Reaktionsgefäßen Schafsubstrat durch 10 mg Rinderalbumin (siehe unten) ersetzt. Es wurde verglichen:

	100 %-Probe	Wiederfindung
Versuch A (n = 7)	440 pg Angiotensin I 10 mg Rinderalbumin 500 µl Tris-HCl-Puffer 50 µl NaCl 0.9 %	440 pg Angiotensin I 10 mg Rinderalbumin 500 µl Tris-HCl-Puffer 50 µl Nierenprobe
Versuch B (n = 8)	730 pg Angiotensin I, direkt im RIA gemessen.	730 pg Angiotensin I 10 mg Rinderalbumin 500 µl Tris-HCl-Puffer 50 µl Nierenprobe

2.9. Biologische Reninbestimmung (BIO)

Sie erfolgte am Blutdruck kochsalzreich ernährter männlicher Ratten nach Vorbehandlung mit Pentoliniumtartrat unter Pentobarbitalnarkose (65). Es wurde die BOUCHER'sche Mikromethode in der Modifikation nach KRAUSE et al. (56) und MALL (65) verwendet. Die biologischen Bestimmungen (Inkubation und Tierversuch) verdanke ich Frau V. SCHÖNHERR[a].

Zum Vergleich der biologischen und der radioimmunologischen Bestimmungsmethode wurden aliquote Mengen von 32 Gewebeproben aus 17 Nieren bestimmt, so daß nur Inkubation und Angiotensinbestimmung ($/ug\ AII/g_{NG} \cdot h$, bzw. $/ug\ AI/g_{NG} \cdot h$) unterschiedlich waren.

2.10. Differentialzentrifugation

2.10.1. Geräte und Material für die Ultrazentrifugation

1) BECKMAN UZ SPINCO 2500 Typ LL 50 B[b]
   Rotor SW 27: 24300 UpM ≙ 80000 g;
   Rotor SW 40: 25400 UpM ≙ 80000 g;
   Rotor SW 50: 29000 UpM ≙ 80000 g;

2) SORVALL SUPERSPEED RC-2-B[b],
   automatic refrigerated zentrifuge;
   Rotor SS 34: 10000 UpM ≙ 12000 g;

3) BECKMAN Centrifuge tubes (Cellulose Nitrate, Nr. 331101);
4) Liquemin[R], Heparin, Hofmann-La Roche, Grenzach;
5) Saccharose (reinst), Merck Art. 7653.

---

[a] Labor PD Dr. K. HAYDUK (Abt. Inn. Med. III, Med. Univ. Klinik Tübingen; Direktor: Prof. Dr. K. KOCHSIEK).

[b] Labor Prof. Dr. P. BERG (Abt. Inn. Med. II, Med. Univ. Klinik Tübingen; Direktor: Prof. Dr. H.D. WALLER).

2.10.2. Differentialzentrifugation des Nierengewebes

A) Vollständige Homogenisation

Die Gewebeproben wurden in aqua bidestillata 5mM EDTA bei 4°C homogenisiert, bis keine Partikel mehr zu erkennen waren. Die erste Fraktion bildete der Oberstand des bei 2700 g zentrifugierten Homogenisates. Davon wurde ein Aliquot 30 Minuten bei 4°C und 80000 g ultrazentrifugiert. Das resuspendierte Sediment nach 80000 g wurde als Partikelfraktion, der Oberstand als Fraktion des löslichen Renins bezeichnet.

B) Schonende Homogenisation

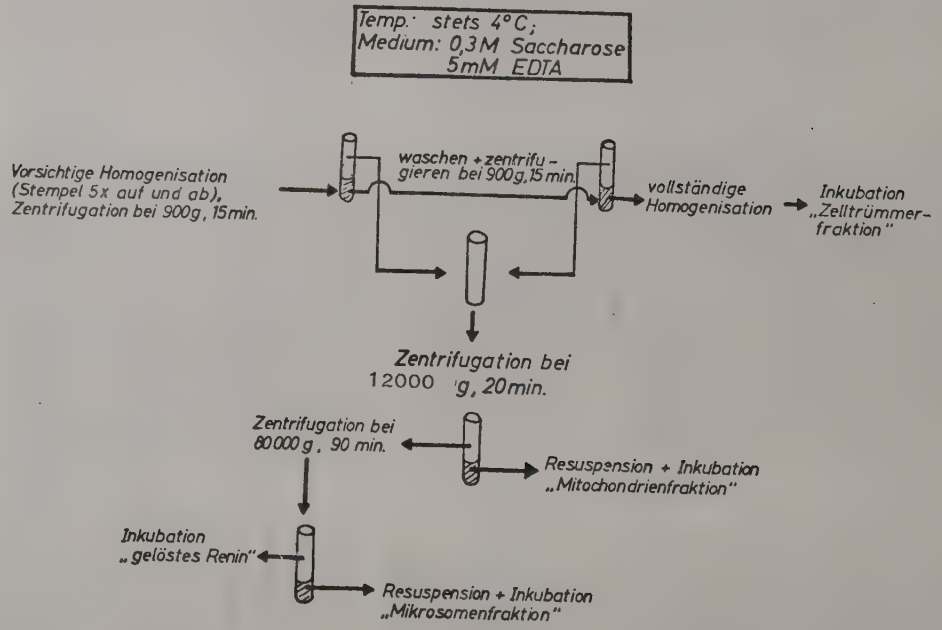
Die Differentialzentrifugation wurde nach GANTEN (36) in Anlehnung an KOENIG et al. (53) und WHITTAKER (109) durchgeführt (s. Abbildung 4, Seite 20). Das mit der Schere zerkleinerte Nierengewebe wurde bei 4°C in 0.3 M Saccharose 5 mM EDTA vorsichtig homogenisiert, wobei der Stempel des Homogenisators stets nur fünfmal auf und ab bewegt wurde. Diese schonende Behandlung des Gewebes sollte eine Ruptur der Reningranula verhindern, die sedimentiert werden sollten.

Das Homogenisat wurde bei 4°C und 900 g zentrifugiert, der Oberstand aufbewahrt, das Sediment gewaschen und nochmals mit 900 g zentrifugiert (s. Abbildung 4, Seite 20). Das zweite Sediment nach 900 g-Zentrifugation wurde in 0.3 M Saccharose vollständig homogenisiert und als Fraktion der Zelltrümmer bestimmt.

Die Oberstände wurden vereinigt, Heparin (0.02 % v/v) zugegeben und in der Kälte zentrifugiert. Heparin sollte die Adhäsion der Gewebepartikel aneinander hemmen (36), ohne die Reninaktivität zu beeinflußen (48, 56). Das resuspendierte 12000 g-Sediment wurde als Mitochondrienfraktion bezeichnet. Der Oberstand wurde 90 Minuten bei 80000 g ultrazentrifugiert. Die Mikrosomenfraktion bildete das 80000 g-Sediment, wogegen der Oberstand das sogenannte lösliche Renin enthielt.

Die so gewonnenen Fraktionen der Zelltrümmer, der Mitochondrien, der Mikrosomen und des 80000 g-Oberstandes besaßen zusammen die gesamte Reninmenge einer Probe.

Abbildung 4: Differentialzentrifugation bei schonender Homogenisation.



3. Ergebnisse

3.1. Radioimmunoassay

3.1.1. Qualitätsprüfung des RIA

Radioimmunoassays erfordern zahlreiche Pipettiervorgänge kleiner Volumina, da sie viele unterschiedliche Komponenten enthalten; sie sind deshalb weniger präzise als chemische Nachweismethoden (75). Bei unseren Untersuchungen fanden wir für Doppelbestimmungen von 80 Proben, das waren etwa 10 % aller Bestimmungen, eine mittlere Abweichung von 13.2 $\pm$ 12.4 % des jeweils kleineren Wertes, oder einen Variationskoeffizienten von v = 8.3 $\pm$ 7.1 %. Sechs Reninproben wurden in zwei verschiedenen RIA-Ansätzen bestimmt, und ihre mittlere Differenz betrug 10.6 $\pm$ 6.8 % des kleineren Wertes, entsprechend einem v = 7.0 $\pm$ 6.8 %. Für Proben der Standardverdünnung lag die Variation zwischen den RIA-Ansätzen für 400 pg AI (n = 20) bzw. 500 pg AI (n = 7) bei 3.6 % und 10.2 %. Der Korrelationskoeffizient (r) der Regressionsgeraden hatte bei 22 Bestimmungen im Durchschnitt den Wert r = 0.991 $\pm$ 0.007 (SD). Die Nachweisgrenze des RIA lag bei 20 pg Angiotensin I. Der Antikörper im Kit war hochspezifisch für Angiotensin I, eine Kreuzreaktion mit Angiotensin II fand nicht statt (90).

3.1.2. Einfluß des Nierenleerwertes auf die Reninbestimmung im RIA

In verschiedenen RIA-Ansätzen wurden 26 Doppelproben, die je 400 pg AI oder 500 pg AI (theoretischer 100 %-Wert) aus dem Kit enthielten, mit und ohne Zugabe von 50 µl des Nierenleerwertes bestimmt. Der Volumenausgleich in den Parallelproben ohne Leerwert erfolgte mit Trispuffer. Mit Leerwert in der Probe fanden sich 101.5 $\pm$ 14.1 (SD) % der zugegebenen 400 pg (bzw. 500 pg) Angiotensin I, ohne ihn wurden nur 72.6 $\pm$ 5.5 % des Angiotensins gemessen.

Ein Ausgleich der Bestandteile des Inkubationsmediums durch den Leerwert bei Proben im RIA-Ansatz, die vorher nicht inkubiert wurden (z.B. Standardproben), verhinderte damit eine systematisch zu hohe Bestimmung der renalen Reninkonzentration.

3.2. Reninextraktion aus dem Nierengewebe

3.2.1. Doppelhomogenisation des Gewebes

Vergleich der absoluten Reninkonzentration ($/_{ug}$ AI/g_{NG}·h) in den Probengruppen A, B und C (s. Seite 8):
Gruppe A: Reninmenge im Oberstand nach einmaliger Homogenisation;
Gruppe B: Reninkonzentration in den vereinigten Oberständen;
Gruppe C: Reninkonzentration im Oberstand nach zweifacher Gewebehomogenisation.

Tabelle 2: Absolute Reninkonzentration ($/_{ug}$ AI/g_{NG}·h) in den Probengruppen A, B und C.

Probe Nr.	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe A ------ in % von B ---	Gruppe C
1	37.5	34.4	6.8	109.0 %	19.8 %
2	13.7	18.1	2.6	75.7 %	14.4 %
3	22.7	36.8	3.3	61.7 %	9.0 %
4	24.4	39.2	7.8	62.2 %	19.9 %
5	30.3	74.5	7.9	40.7 %	10.6 %
6	23.2	37.1	10.6	62.5 %	28.6 %
$\bar{x} \pm$ SD:				68.6 % ± 22.7 %;	17.1 % ± 7.2 %.

Im ersten Oberstand (Probengruppe A) wurde mit 68.8 ± 22.7 % des Gesamtrenins in den vereinigten Oberständen (Gruppe B) deutlich weniger Renin extrahiert, und aus dem ersten Sediment (Gruppe C) wurden nochmals signifikant ($p < 0.01$) 17.1 ± 7.2 % der Reninmenge in den vereinigten Oberständen gewonnen.

3.2.2. Resuspension des ersten Sediments

Vergleich der absoluten Reninkonzentration ($/_{ug}$ AI/g_{NG}·h) in den Probengruppen A, B und C (s. Seite 8).
Gruppe A: Reninkonzentration im ersten Oberstand;
Gruppe B: Reninmenge in den vereinigten Oberständen (Gesamtrenin);

Gruppe C: Reninkonzentration im zweiten Oberstand nach Resuspension des primären Sediments.

Tabelle 3: Absolute Reninkonzentration (μg AI/$g_{NG} \cdot h$) in den Probengruppen A, B und C.

Probe Nr.	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe A ------ in % von B ---	Gruppe C
1	54.3	57.4	9.4	94.6 %	16.4 %
2	28.4	27.9	5.7	101.8 %	20.4 %
3	64.8	62.0	12.9	104.5 %	20.8 %
4	139.8	192.4	75.1	72.7 %	39.0 %
5	138.8	205.9	21.1	67.4 %	10.2 %
6	25.9	27.2	7.9	95.2 %	29.0 %
7	153.5	----	19.8	89.4 %	22.6 %
8	75.3	----	23.1	± 15.5 %	± 10.1 %
9	13.2	----	15.3		
10	19.0	----	56.0		
11	110.8	----	73.7		
12	152.8	----	87.6		
13	932.5	----	311.5		
14	1533.0	----	127.1		

Gruppe A enthielt jetzt (n = 6) im Mittel 89.4 ± 15.5 % und Gruppe C 22.6 ± 10.1 % der Reninmenge in den vereinigten Oberständen (Gruppe B).

Wurde die Reninmenge des ersten Sedimentes (Gruppe C) in prozentualer Abhängigkeit vom Reningehalt im Oberstand nach einmaliger Aufarbeitung (Gruppe A) errechnet, so fanden sich bei der Doppelhomogenisation 25.9 ± 11.6 (SD) %, und für die Resuspension lag der Anteil bei 55.5 ± 74.6 (SD) %.

3.2.3. Reninmenge im Gewebehomogenisat

Tabelle 4: Reninwerte ($/_{ug}$ AI/g_{NG}·h) in den vereinigten Oberständen und im Homogenisat ohne zusätzliche Zentrifugation.

Probe Nr.	Oberstände	Homogenisat	Homogenisat (in % d. Oberstände)
1	290.8	280.4	96.4 %
2	280.9	135.0	48.1 %
3	114.7	87.1	75.9 %
4	28.0	37.8	135.0 %
5	672.7	523.2	77.8 %
$\bar{x} \pm$ SD:			86.6 ± 32.1 %.

Im Homogenisat wurde mit 86.6 ± 32.1 % eine um 13.4 % geringere Reninkonzentration nachgewiesen als in den vereinigten Oberständen.

Die einfache Resuspension des ersten Sedimentes lieferte bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 20 % deutlich mehr Renin als die Methode der Doppelhomogenisation. Da die vereinigten Oberstände auch mehr Reninaktivität als das Homogenisat enthielten, das sich praktisch schlechter verarbeiten ließ, wurden routinemäßig die vereinigten Oberstände zur Reninbestimmung verwendet (s. Punkt 2.8.2, Seite 14f).

3.2.4. Ultraschallbehandlung verschiedener Gewebefraktionen

Tabelle 5: Wirkung der Ultraschallbehandlung auf die Reninkonzentration. Den 100 %-Vergleichswert bildeten nicht mit Ultraschall behandelte aliquote.

Gewebefraktion	Reninkonzentration nach Ultraschallbehandlung
Homogenisat:	99.0 ± 17.7 % (n = 6)
2700 g-Sediment	84.8 ± 33.6 % (n = 11)
80000 g-Sediment	90.8 ± 26.6 % (n = 8)
10 W Ultraschall:	73.9 ± 34.5 % (n = 7)
35 W Ultraschall:	96.4 ± 23.0 % (n = 18).

Im Mittel fanden sich bei allen mit Ultraschall behandelten Proben 90.1 ± 27.9 % der Reninkonzentration der unbehandelten aliquote. Eine Differenzierung in die untersuchten Fraktionen ist in Tabelle 5 dargestellt. Da sich in keinem Fall eine Steigerung der Reninausbeute durch Ultraschallbehandlung erzielen ließ, wurde Ultraschall bei der standardisierten Gewebeaufarbeitung nicht verwendet.

3.3. Renin - Substrat - Reaktion

3.3.1. Abhängigkeit der enzymatischen AI-Bildung vom Substratgehalt des Inkubationsmediums

Die Versuche V1-3 wurden trotz geringer methodischer Unterschiede (s. Tabelle 1, Seite 10) gemeinsam ausgewertet, da hier Proben aus derselben Niere verarbeitet wurden. Der Reaktionsverlauf zeigte anfänglich bei geringen Substratkonzentrationen im Inkubationsmedium niedrige Reninwerte, die mit steigender Substratkonzentration zunahmen bis zu einer maximalen Konzentration von 80 $/_{ug}$ AI/g_{NG}·h. Bei über 30 bis 40 mg/ml ansteigenden Substratkonzentrationen fielen die Reninwerte wieder auf 50 $/_{ug}$ AI/g_{NG}·h ab (s. Tabelle 6, Seite 26). In ähnlicher Weise stiegen auch die Reaktionskurven aus Versuch V4 mit zunehmendem Substratgehalt steil an und fielen dann bei noch höheren Substratkonzentrationen wieder ab. Die höchsten Reninwerte für diese Niere betrugen in Verdünnung V4A 1200 $/_{ug}$ AI/g_{NG}·h und wurden bei 12 bis 20 Milligramm Substrat pro Milliliter Inkubationsmedium gemessen. Wurde dieses Gewebe nochmals 1:1 verdünnt (Verdünnung V4B), so ergaben sich gegenüber Versuch V4A ca. 1.6fach höhere Reninwerte. Die Maximalwerte mit 2000 $/_{ug}$ AI/g_{NG}·h wurden für 20 bis 30 mg Substrat pro Milliliter Inkubationsmedium gemessen (s. Tabelle 7, Seite 26 und Abbildung 5, Seite 27).

Im ersten, ansteigenden Teil der graphischen Darstellungen (Abbildung 5, Seite 27) zeigte sich damit bei allen Teilversuchen eine Sättigungskinetik, die sich in einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) - als Reninkonzentration gemessen - ausdrückte. Der anschließende Kurvenabfall auf niedrigere Reninwerte entsprach einer Hemmung der Renin-Reninsubstrat-Reaktion.

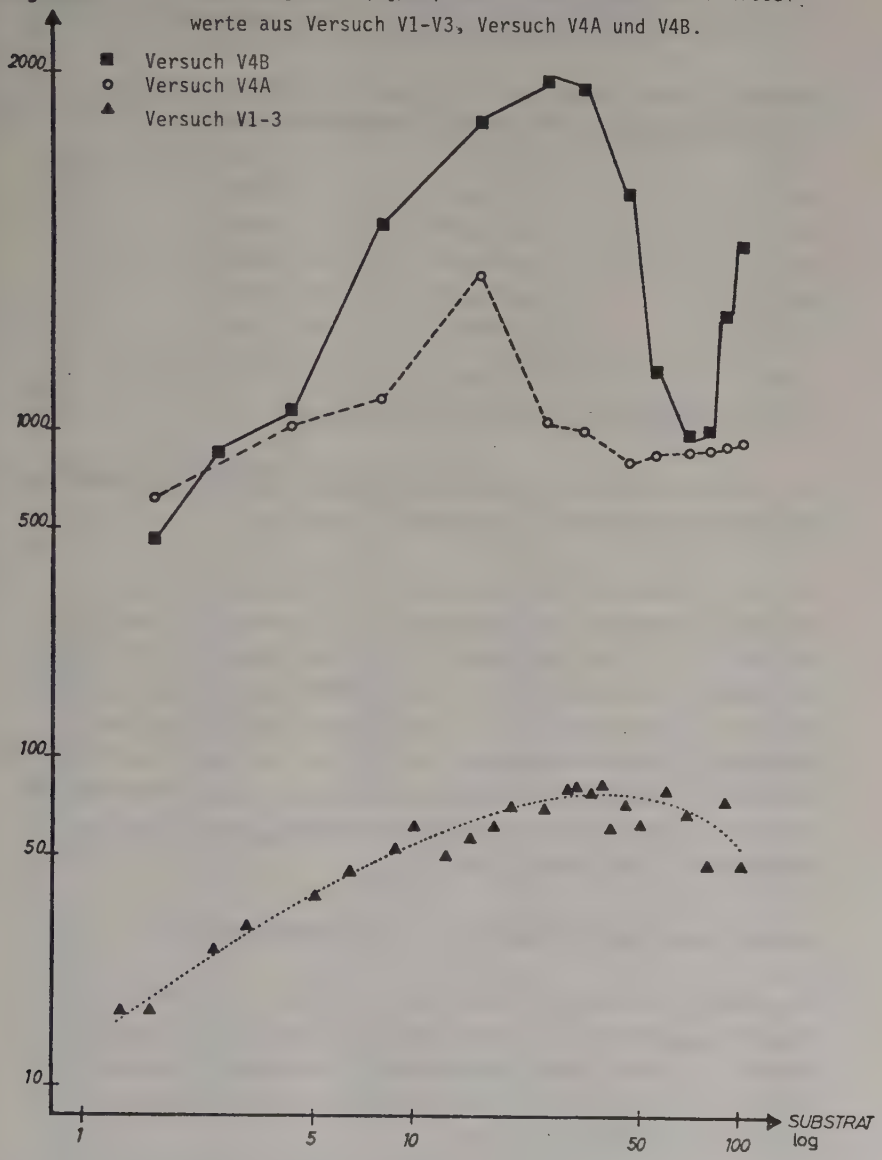
Tabelle 6: Reninkonzentration ($/_{ug}$ AI/g_{NG}·h) in Abhängigkeit vom Substratgehalt (mg/ml) des Inkubationsmediums; (V1 - V3, Mittelwerte ± SD).

Substrat	n	Reninkonzentration	Substrat	n	Reninkonzentration
1.3	3	16.7 ± 0.9	30.0	5	82.1 ± 9.7
1.6	3	16.8 ± 2.1	32.5	3	83.2 ± 1.6
2.5	3	26.1 ± 0.9	35.0	5	79.7 ± 8.9
3.1	3	30.4 ± 1.0	37.5	3	82.4 ± 8.2
5.0	3	37.5 ± 4.0	40.0	8	60.5 ± 15.9
6.3	3	44.8 ± 1.5	45.0	3	74.2 ± 9.3
8.8	2	52.9 ± 1.6	50.0	6	63.2 ± 17.6
10.0	8	61.7 ± 15.6	60.0	3	80.5 ± 1.6
12.5	5	50.9 ± 4.3	70.0	3	68.5 ± 8.1
15.0	2	57.5 ± 2.9	80.0	6	47.5 ± 10.0
17.5	2	62.4 ± 8.3	90.0	3	74.3 ± 8.6
20.0	8	70.1 ± 13.7	100.0	6	48.2 ± 19.6
25.0	8	70.0 ± 13.1			

Tabelle 7: Reninkonzentration ($/_{ug}$ AI/g_{NG}·h) in Abhängigkeit vom Substratgehalt (mg/ml) im Inkubationsmedium bei Versuch V4, Verdünnung A und B.

Verdünnung V4A:			Verdünnung V4B:		
Substrat	n	Reninkonzentration	Substrat	n	Reninkonzentration
1.6	1	619.4	1.6	1	464.3
2.5	1	816.3	2.5	1	845.3
4.1	2	1015.6 ± 42.3	4.1	2	1074.7 ± 96.1
7.9	3	1103.7 ± 67.2	7.9	3	1349.2 ± 106.3
15.5	4	1247.9 ± 164.7	15.5	3	1719.3 ± 53.5
25.0	3	1040.3 ± 115.4	25.0	3	1981.9 ± 281.5
32.5	3	1002.8 ± 310.0	32.5	3	1919.1 ± 142.4
45.0	3	823.2 ± 71.1	45.0	3	1444.8 ± 225.1
55.0	1	849.1	55.0	2	1123.0 ± 59.3
70.0	1	886.7	70.0	1	987.6
80.0	1	892.4	80.0	1	1005.0
90.0	1	919.9	90.0	1	1188.8
100.0	1	937.2	100.0	1	1310.9

Abbildung 5: Reninkonzentration ($/_{ug}$ AI/g_{NG}·h) in Abhängigkeit vom Substratgehalt (mg/ml) des Inkubationsmediums. Mittelwerte aus Versuch V1-V3, Versuch V4A und V4B.



3.3.2. MICHAELIS-Konstante und optimale Substratkonzentration

Tabelle 8: Michaeliskonstanten der Versuche V1 bis V4. (Einheit: Milligramm Substrat pro Milliliter Inkubationsmedium)

V1:	K_m = 4.38 mg/ml;	(r = 0.989)
V2:	K_m = 5.93 mg/ml;	(r = 0.925)
V3:	K_m = 1.41 mg/ml;	(r = 0.929)
V4A:	K_m = 1.97 mg/ml;	(r = 0.993)
V4B:	K_m = 7.25 mg/ml;	(r = 0.981)
$\bar{x} \pm$ SD:	4.19 $\pm$ 2.50 mg/ml	(r = 0.963 $\pm$ 0.033).

r: Korrelationskoeffizient der Regressionsgerade.

Bei starker Streuung der Einzelwerte ergab sich eine mittlere Michaeliskonstante von K_m = 4.19 $\pm$ 2.50 mg/ml (s. Tabelle 8).

Als optimal wurde die Substratkonzentration angesehen, von der bei üblichen Bestimmungen nicht mehr als 10 % (79) verbraucht wurden, und die noch nicht in den abfallenden Teil der Reaktionskurve fiel (siehe Abbildung 5, Seite 27). Das gilt nach HUMMERICH und KRAUSE (50) sowie ORTH et al. (79) für das 7.5- bis Zehnfache der Michaeliskonstante. Danach wurden Substratkonzentrationen zwischen 31.4 mg/ml und 41.9 mg/ml errechnet. Für Routinebestimmungen wurde ein gerundeter Mittelwert von 35.0 mg/ml gewählt, der auch mit den graphischen Darstellungen in Einklang stand (s. Abbildung 5, Seite 27).

3.3.3. Reninwerte in Abhängigkeit von der Gewebeverdünnung

Die doppelte Verdünnungsstufe des Nierengewebes in Versuch V4B gegenüber V4A (s. Tabelle 1, Seite 10) bewirkte, daß in Versuch V4B durchschnittlich 1.6fach höhere Reninkonzentrationen gemessen wurden als in V4A. Der Unterschied war besonders deutlich, wenn im Inkubationsmedium Substratsättigung vorlag.

Die Auswertung der Versuche (s. Tabelle 9-11, Seite 29) zeigte, daß bei

Absolute Reninkonzentration (μg AI/$g_{NG} \cdot h$) in Abhängigkeit von der Gewebeverdünnung im Inkubationsmedium bei drei Nieren (Nr. 18 c, 19 c, 27 c) und drei verschiedenen Substratkonzentrationen:

Tabelle 9: Nierengewebe MK (Nr. 18 c)

	12.5[a]	25.0[a]	40.0[a]	$\bar{x} \pm$ SD
0.61[b]	36.4[c]	40.8[c]	45.3[c]	40.8 ± 4.5[c]
0.82	31.5	39.0	29.0	33.1 ± 5.3
1.22	21.5	30.5	28.2	26.7 ± 4.7
1.63	25.8	37.5	33.7	32.3 ± 6.0
2.45	26.4	29.7	39.0	31.7 ± 6.5
4.89	31.5	41.1	35.2	35.9 ± 4.8
9.78	28.6	32.7	27.3	29.5 ± 2.8
19.56	19.5	23.4	19.3	20.7 ± 2.3

Tabelle 10: Nierengewebe MR (Nr. 19 c)

	12.5[a]	25.0[a]	40.0[a]	$\bar{x} \pm$ SD
0.66[b]	47.4[c]	38.0[c]	40.1[c]	41.8 ± 4.9[c]
0.88	32.4	45.7	30.9	36.3 ± 8.1
1.31	30.5	45.0	62.2	45.9 ± 15.9
1.75	32.6	46.2	54.8	44.5 ± 11.2
2.63	38.1	42.0	58.4	46.2 ± 10.8
5.25	39.6	33.5	37.0	36.7 ± 3.1
10.50	35.9	27.3	28.8	30.7 ± 4.6
21.00	19.0	21.5	20.4	20.3 ± 1.3

Tabelle 11: Nierengewebe TM (Nr. 27 c)

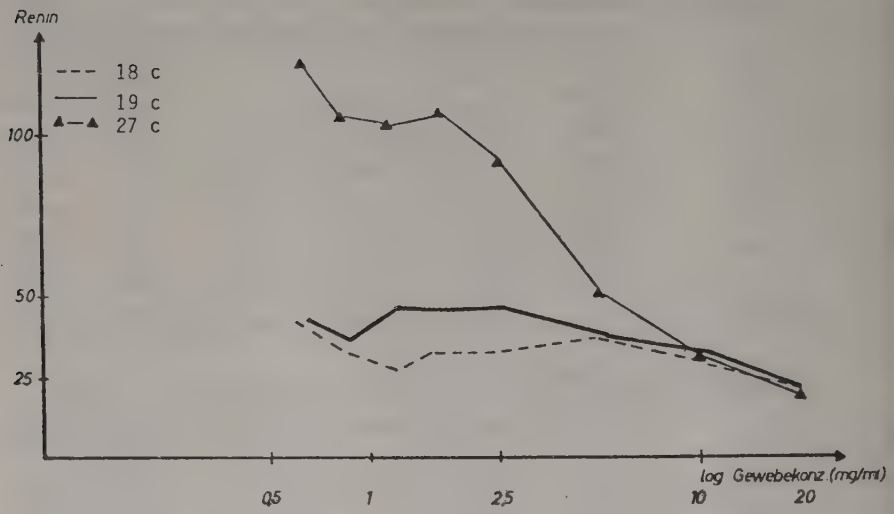
	12.5[a]	25.0[a]	40.0[a]	$\bar{x} \pm$ SD
0.63[b]	90.5[c]	132.6[c]	142.2[c]	121.8 ± 27.5[c]
0.84	108.7	113.8	90.6	104.4 ± 12.2
1.25	93.8	101.7	112.6	102.7 ± 9.4
1.67	99.8	104.9	109.7	104.8 ± 5.0
2.51	87.8	91.9	----	89.9 ± 2.9
5.01	47.7	49.4	51.0	49.4 ± 1.7
10.02	24.7	35.9	30.1	30.2 ± 5.6
20.04	15.5	20.1	20.4	18.7 ± 2.7

[a] Substratkonzentration (mg Substrat/ml Inkubationsmedium)

[b] Gewebekonzentration (mg Nierengewebe/ml Probenflüssigkeit)

[c] Absolute Reninkonzentration.

Abbildung 6: Absolute Reninkonzentration ($_{/}$ug AI/g_{NG}·h) in Abhängigkeit von der Gewebeverdünnung im Inkubationsmedium bei drei Nieren (Nr. 18 c, 19 c, 27 c).



allen drei Geweben die Reninwerte für die verschiedenen Substratkonzentrationen nicht deutlich voneinander zu unterscheiden waren; für die Mittelwerte (s. letzte Spalte in Tabelle 9 - 11) ergab sich eine Streuung von v = 14.7 %.

Der Kurvenverlauf (s. Abbildung 6) zeigte bei steigenden Nierengewebekonzentrationen im Inkubationsmedium einen deutlichen Abfall der Reninwerte. Routinebestimmungen wurden zwischen 0.7 und 2.5 mg/ml Gewebekonzentration durchgeführt, da sich in diesem Bereich ein Plateau der Reaktionskurven mit konstanter Angiotensinbildung zeigte, das eine reproduzierbare Angiotensinbestimmung erlaubte.

3.3.4. Mittlere Gewebekonzentration

Die spezifische Gewebekonzentration lag im Durchschnitt von 85 Bestimmungen bei 2.41 $\pm$ 2.81 (SD) mg/ml.

3.3.5. Interferenz von endogenem Substrat

SKINNER und Mitarbeiter (99) haben Menschen- und Schafsubstrat gemischt und bei der Inkubation festgestellt, daß menschliches Angiotensinogen die Reaktionsrate zwischen Schafsubstrat und menschlichem Renin nicht beeinflußte; diese Ergebnis wurde auch von STOCKIGT et al. (100) bestätigt.

12 Proben aus verschiedenen Nieren wurden nur mit dem möglicherweise im aufgearbeiteten Nierengewebe vorhandenen Substrat in einem sonst unveränderten Substratansatz zur Reaktion gebracht. In keinem Fall ließ sich dabei radioimmunologisch ein Reaktionsprodukt Angiotensin I nachweisen.

3.3.6. Reninreaktion im Inkubationsmedium bei 4°C

Bei 4°C wurden (n = 9) 10.6 ± 4.0 (SD) % der Angiotensinmenge nach Inkubation bei 37°C gebildet.

3.4. Behandlung der Proben nach der Inkubation

Wurden die Proben angesäuert, abgekocht und anschließend neutralisiert, fand sich im Durchschnitt die höchste Reninausbeute (100 %).

Auch das einfache Abkühlen der Proben auf 4°C ergab eine ähnlich hohe Reninausbeute (101.2 ± 22.1 %, s. Tabelle 12, Seite 32). Dabei lagen jedoch keine kontrollierten Versuchsbedingungen vor, weil die Reninreaktion bei 4°C nicht vollständig unterbunden war (siehe oben). Kochte man die Proben nur ab, fanden sich 93.2 ± 26.2 % der Reninmenge in den 100 %-Aliquoten. Für die Probengruppe, in der nur die Säure-Lauge-Behandlung durchgeführt wurde, ergab sich analog ein Prozentsatz von 87.4 ± 20.8 %.

Zwischen den einzelnen Probengruppen (s. Tabelle 12, Seite 32) gab es keine signifikanten Unterschiede. Für Routinebestimmungen wurde die kombinierte Methode mit Abkühlen, Ansäuern, Abkochen und Neutralisieren verwendet, da durch die Säurehydrolyse der Proteine das Inkubations-

Tabelle 12: Behandlung der Proben nach der Inkubation.
(Einheit der absoluten Reninkonzentration: $/^{ug\ AI/g_{NG}\cdot h}$)

Niere Nr.	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
10 cm l	944.0	625.4	741.7	573.8
10 c l	1294.0	824.8	924.2	953.2
11 cm	27.4	29.6	30.1	33.4
11 c	38.1	35.7	28.0	46.0
17 c	25.5	31.5	20.2	26.8
17 cm	23.1	31.2	30.4	29.5
25 c	36.8	24.3	30.4	38.0
25 c	74.5	57.4	45.2	63.4
25 cm	39.2	45.4	37.1	38.2
25 cm	37.1	30.4	33.9	42.9
$\bar{x} \pm SD$:[a]	100.0 %	93.2 %	87.4 %	101.2 %
	$\pm$ 0.0 %	$\pm$ 26.2 %	$\pm$ 20.8 %	$\pm$ 22.1 %

Niere Nr.: siehe Tabelle 16, Seite 40/41.

Gruppe A: Der inkubierte Substratansatz wurde mit 1N HCl auf pH 1.2 angesäuert, 15 Minuten bei 95°C abgekocht, mit 1N NaOH zurücktitriert und 15 Minuten bei 2700 g zentrifugiert.

Gruppe B: Der inkubierte Substratansatz wurde 15 Minuten bei 95°C abgekocht, nicht angesäuert, sondern nur 15 Minuten bei 2700 g zentrifugiert.

Gruppe C: Der Substratansatz wurde nach der Inkubation mit 1N HCl auf pH 1.2 angesäuert, 15 Minuten im Eisbad bei 4°C stehengelassen, dann mit 1N NaOH neutralisiert und zentrifugiert.

Gruppe D: Der eine Stunde bei 37°C inkubierte Substratansatz blieb bei 4°C 15 Minuten im Eisbad stehen, bevor er wie die anderen Proben zentrifugiert wurde.

[a] Die absolute Reninkonzentration jeder Probe in Gruppe A wurde 100.0 % gesetzt, die entsprechenden Werte in Gruppe B-D in Abhängigkeit davon errechnet und für jede Gruppe der Mittelwert gebildet.

medium geklärt und nicht gelartig eingedickt wurde, die Bildung eines Sedimentes durch ausgeflockte Proteine (wie beim Abkochen allein) verhindert wurde und kein Angiotensin durch unspezifische Adsorption (79) verloren ging. Eine abschließende Zentrifugation erübrigte sich, da sich kein Sediment bilden konnte.

3.5. Reproduzierbarkeit der Gesamtmethode

3.5.1. Qualität der Proteinbestimmung

Bei fünf Proteinbestimmungen ergab sich ein mittlerer Korrelationskoeffizient von $r = 0.998 \pm 0.001$ (SD), was einer Variation zwischen verschiedenen Ansätzen von 0.1 % entspricht.

Die mittlere Differenz von 20 Doppelbestimmungen betrug 12.6 ± 7.7 % des kleineren Wertes (oder $v = 8.2 \pm 4.9$ %).

3.5.2. Mehrfachbestimmungen einer Probe

Die Ergebnisse von Mehrfachbestimmungen der gleichen Probe in verschiedenen Substratansätzen bei gleichem RIA wurden in Tabelle 13 dargestellt. Es fand sich eine mittlere Streuung von $v = 8.0 \pm 3.4$ %, die nicht von der des RIA allein (s. Seite 21) zu unterscheiden war.

Tabelle 13: Mehrfachbestimmungen einer Gewebeprobe; Mittelwerte der Variationskoeffizienten ($\bar{v} \pm SD$).

Art der Mehrfachbetimmung	n	$\bar{v} \pm SD$
Doppel-,	10	7.27 ± 4.65 %
Dreifach-,	24	6.81 ± 4.13 %
Vierfach-,	2	11.54 ± 3.47 %
Siebenfach-,	2	6.43 ± 1.23 %
Mittelwert:		8.0 ± 3.4 %.

3.5.3. Wiederfindung von Angiotensin I

Die Angiotensinasenaktivität des Nierengewebes konnte im Inkubationsmedium vollständig blockiert werden; in Versuch A (s. Seite 20) betrug die Wiederfindungsrate 101.7 ± 13.5 %, in Versuch B erreichte sie 98.6 ± 15.3 % des zugegebenen Angiotensin I.

3.6. Vergleich zwischen biologischer und radioimmunologischer Reninbestimmung im Nierengewebe

3.6.1. Zielsetzung

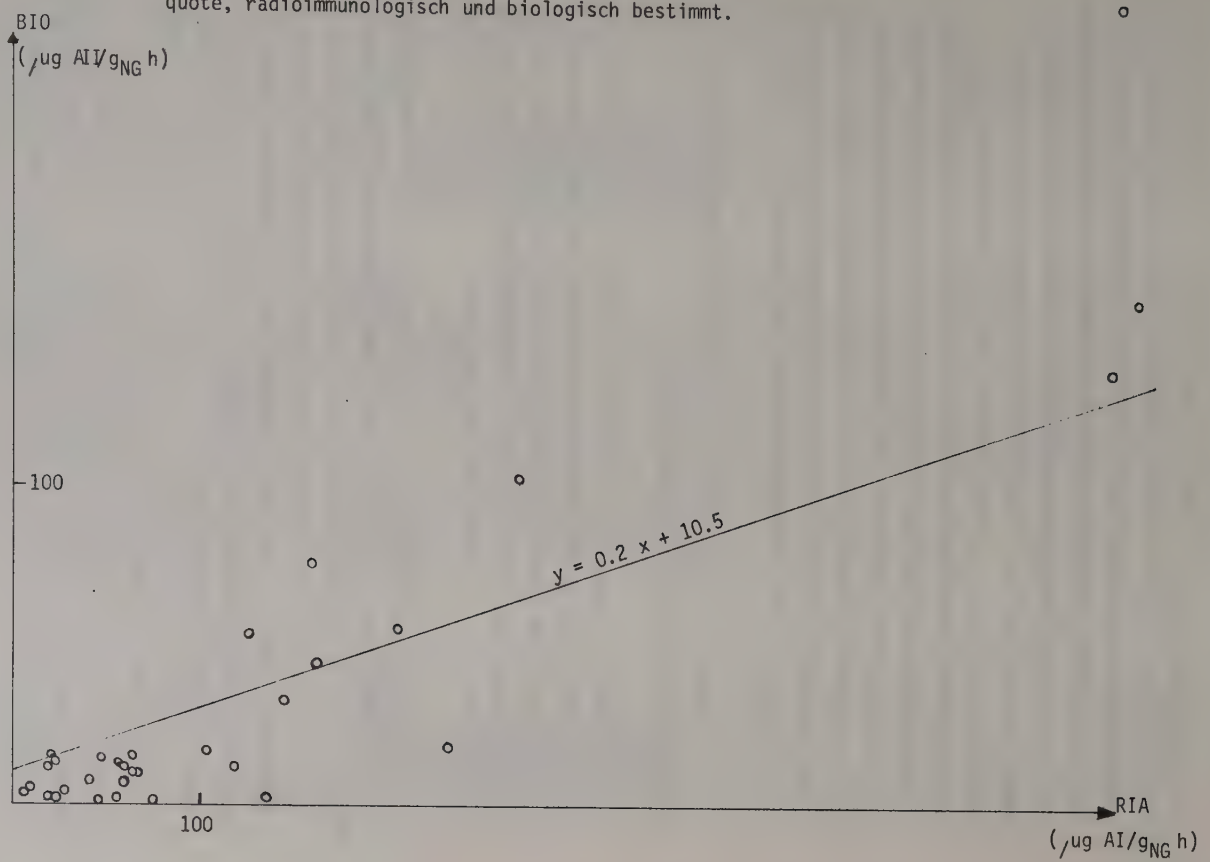
Der Radioimmunoassay hat gegenüber dem Bioassay den Vorteil größerer Empfindlichkeit, und er erlaubt die Bestimmung einer größeren Probenzahl (91). Biologische Methoden sind zeitraubend, kompliziert und unterscheiden nicht zwischen Angiotensin I und AII (55). Obwohl bereits einige Vergleiche zwischen biologischen und radioimmunologischen Methoden (15, 22, 33, 43, 55, 57) erfolgt sind, konnten die Ergebnisse keine einheitliche Beziehung zwischen Reninwerten aus beiden Techniken aufzeigen (55, 91).

Da der Radioimmunoassay den Bioassay ersetzen sollte, wurde die Beziehung zwischen beiden untersucht. Bei guter Obereinstimmung beider Methoden wurde ein Vergleich mit Ergebnissen, die mit der verbreiteten BOUCHER'schen Methode (12) gewonnen wurden, möglich.

3.6.2. Ergebnisse des Vergleichs

Zwischen beiden Methoden fand sich, bei einzelnen abweichenden Wertepaaren, eine mit $r = 0.856$ hoch signifikante ($p < 0.01$) Obereinstimmung, wobei die biologische Methode mit durchschnittlich 25.1 ± 20.0 % der radioimmunologisch gemessenen Reninkonzentrationen wesentlich niedrigere Werte lieferte.
Die Gleichung der Ausgleichsgerade zwischen den Wertepaaren lautet $y = 0.2\ x + 10.5$; für "x" wird der RIA-Wert eingesetzt (s. Abbildung 7, Seite 35).

Abbildung 7: Vergleich der Reninkonzentrationen identischer Aliquote, radioimmunologisch und biologisch bestimmt.



3.7. Ergebnisse der Differentialzentrifugation

3.7.1. Vorbemerkungen

Obwohl bereits eine Anzahl von Arbeiten über die subzelluläre Lokalisation von Renin im Nierengewebe verschiedener Tierspezies (36, 41, 72, 77, 89) vorliegt, wurden menschliche Nieren bisher noch nicht untersucht. Unterschiedliche Techniken und Renineinheiten führten zu verschiedenen Aussagen. Da einige Autoren (71, 72) Unterschiede in der subzellulären Verteilung spezifischer und absoluter Reninaktivität fanden, wurden die Reninkonzentrationen der subzellulären Fraktionen in beiden Einheiten bestimmt. Zuvor wurde der Einfluß der Homogenisationsintensität auf die Reninverteilung untersucht, da SCHMID et al. (89) und NUSTAD und RUBIN (77) auf deren Bedeutung hinweisen. Zusätzlich wurde versucht, eine Reningranulafraktion zu gewinnen.

3.7.2. Subzelluläre Verteilung der Reninkonzentrationen nach vollständiger und schonender Homogenisation

Der Einfluß der Homogenisationsintensität auf die subzelluläre Verteilung der absoluten Reninkonzentrationen wurde am Verhältnis des Reningehaltes der Partikelfraktion (sie enthält die Mikrosomen- und die Mitochondrienfraktion) zu der im 80000 g-Oberstand gelösten Reninmenge gemessen, die gleich 100 % gesetzt wurde.

Bei vollständiger Homogenisation des Gewebes betrug die Reninmenge in der Partikelfraktion 28.2 %, bei schonender Gewebeaufarbeitung fanden sich 24.0 % der Reninkonzentration im 80000 g-Oberstand. Die Prozentwerte (n = 10) beider Techniken ließen sich statistisch nicht unterscheiden, jedoch streuten die Einzelwerte bei vollständiger Homogenisation vierfach mehr als bei schonender Arbeitsweise, die wesentlich besser reproduzierbar waren.

3.7.3. Subzelluläre Verteilungsmuster der Reninkonzentrationen

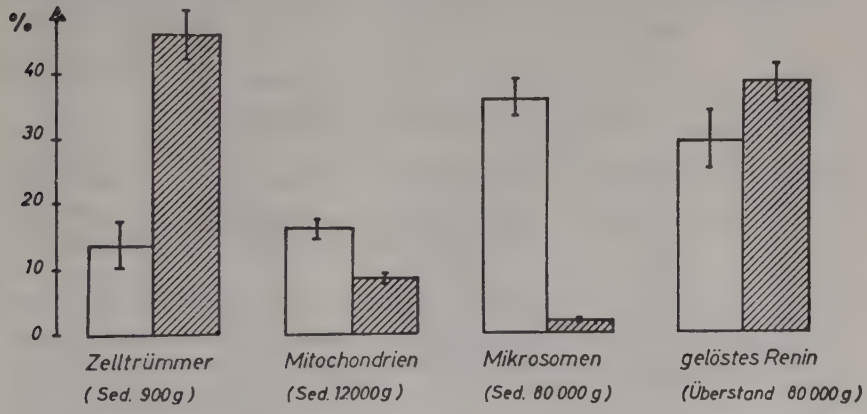
In den Tabellen 14 und 15, auf Seite 38 sind die Reninwerte der zehn untersuchten Proben dargestellt; der prozentuale Anteil der Fraktionen an der gesamten Reninmenge jeder Probe wurde bestimmt und der Mittelwert gebildet (s. letzte Zeile in Tabelle 14 und 15). Abbildung 8 vergleicht die Verteilung der absoluten und der spezifischen Reninkonzentration auf subzelluläre Fraktionen.

Abbildung 8: Prozentuale Verteilung von spezifischer und absoluter Reninkonzentration auf subzelluläre Fraktionen (die gesamte Reninmenge einer Probe sind 100 %).

□ spezifische Reninkonzentration

▨ absolute Reninkonzentration

⊥ Mittelwert ± SE



Die Mitochondrienfraktion enthielt 8.4 ± 3.2 % der absoluten, gegenüber 16.2 ± 4.3 % der spezifischen Reninkonzentration. In der Mikrosomenfraktion fand sich absolut nur 2.0 ± 0.8 % der gesamten Reninmenge, spezifisch betrug ihr Anteil 35.8 ± 9.4 %; damit wurde in dieser Fraktion die spezifische Reninaktivität in partikulärer Form 18fach gegeüber absolut angereichert. Die niedrigen absoluten Reninwerte in der Mitochondrien- und der Mikrosomenfraktion harmonierten auch praktisch mit den kleinvolumigen Sedimenten, die diesen Fraktionen entsprachen.

Tabelle 14: Verteilung der absoluten Reninkonzentration ($_{/}$ug AI/g_{NG}·h) auf subzelluläre Fraktionen bei schonender Homogenisation.

Niere	Zelltrümmer (S 900 g)	Mitochondrien (S 12000 g)	Mikrosomen (S 80000 g)	Oberstand (O 80000 g)
3 c	111.4	14.9	2.2	101.1
5 c	10.5	1.8	0.6	9.6
6 c	211.8	38.7	7.1	223.3
7 c/cm	155.5	28.1	9.8	126.1
9 c	137.4	69.0	14.2	236.9
13 c	99.0	21.6	4.6	117.9
16 c	8.6	3.3	0.7	15.8
19 c	65.7	6.5	1.8	63.7
19 cm	30.5	5.0	1.4	28.7
28 cm	121.7	6.9	1.5	28.5
$\bar{x} \pm$ SD (%):	46.0 ± 12.9;	8.4 ± 3.2;	2.0 ± 0.8;	43.7 ± 10.1.

Tabelle 15: Verteilung der spezifischen Reninkonzentration (mg AI/g_{EW}·h) auf subzelluläre Fraktionen bei schonender Homogenisation.

Niere	Zelltrümmer (S 900 g)	Mitochondrien (S 12000 g)	Mikrosomen (S 80000 g)	Oberstand (O 80000 g)
3 c	3.90	2.96	10.59	4.57
5 c	4.22	2.13	2.86	1.24
6 c	2.41	7.69	13.08	19.04
7 c/cm	2.49	2.28	5.76	12.69
9 c	3.09	4.18	8.94	14.51
13 c	1.45	1.91	3.66	6.34
16 c	0.22	0.18	0.53	0.64
19 c	1.72	2.55	7.11	3.09
19 cm	0.41	1.78	3.86	2.35
28 cm	1.04	2.37	4.35	2.82
$\bar{x} \pm$ SD (%):	13.6 ± 10.1;	16.2 ± 4.3;	35.8 ± 9.4;	34.4 ± 14.4.

Die Gewebeproben in beiden Tabellen sind identisch!
Niere: siehe Tabelle 16, Seite 40/41.

3.8. Krankheitsbilder und Reninkonzentration im Nierengewebe

3.8.1. Patienten

Von den 24 Nieren und 4 Nierenbiopsien stammten
- 18 Gewebe von Patienten der Medizinischen Universitätsklinik, Tübingen, (Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. M. EGGSTEIN),
- 7 Proben von Patienten der Universitäts-Kinderklinik, Tübingen, (Direktor: Prof. Dr. J. BIERICH),
- 2 Nieren von Patienten der Abteilung für Urologie der Chirurgischen Universitätsklinik, Tübingen, (Direktor: Prof. Dr. K.H. BICHLER),
- eine Niere von einer Patientin der Medizinischen Universitätsklinik, Köln, Lehrstuhl für Innere Medizin II (Direktor: Prof. Dr. W.KAUFMANN).

Die Nieren wurden entweder durch Nephrektomie oder postmortal gewonnen, wobei darauf geachtet wurde, daß nicht mehr als acht Stunden zwischen Tod und Nierenentnahme verstrich, so daß sich der Reningehalt nicht veränderte (34, 48, 65).

In Tabelle 16, Seite 40/41 werden die Patienten und ihre Diagnosen, in Tabelle 17, Seite 42/43 die Renin- und Proteinwerte der Gewebe angegeben.

3.8.2. "Normalwerte" für Renin im Nierengewebe

Da wir nur zwei Nieren (Nr. 8, 26) mit histologisch unauffälligem[a] Gewebe verarbeiten konnten, erfolgte die Festlegung der "Normalwerte" in Zusammenarbeit mit SAUTER (88), der die gleiche Methodik verwendete. (s. Tabelle 18, Seite 44).

---

[a] Die histologische Beurteilung der Nierengewebe wurde vom Pathologischen Institut der Universität Tübingen (Direktor: Prof.Dr. A.BOHLE) durchgeführt.

Tabelle 16: Patienten und Diagnosen

Abkz.	Nr.	m/w	Geb.-Dat.	Diagnosen
AT	1	w	19.02.13	Funktionslose Schrumpfniere links; Harnsäureausgußstein links; Nephrektomie links.
AE	2	w	29.07.76	Hypertonie bei Mehrfachversorgung der rechten Niere; Nierenbiopsie rechts.
BL	3	m	16.10.29	Rezidivierende Herzinfarkte; Kreislaufversagen; Arteriosklerose der Nierengefäße.
BG	4	m	29.10.68	Links prävesicale Uretherstenose; hydronephrotische Schrumpfniere links; Megaurether; Nephrektomie links.
CS	5	m	26.01.44	Steinschrumpfniere rechts; Nephrektomie rechts.
FG	6	m	25.09.28	Aortorenaler Bypass; Thrombosierung des Transplantates.
GH	7	m	31.05.32	Maligne Hypertonie; Nephrektomie rechts.
HH	8	w	03.05.21	Hypernephroides Carcinom am linken, oberen Nierenpol; Splenektomie und Nephrektomie links.
KG	9	m	01.12.66	Vesicourethraler Reflux 3. bis 4. Grades beidseits.
KH	10	m	05.03.39	Akzelerierte Hypertonie; Maligne Nephrosklerose; Nephrektomie beidseits.
KM	11	w	09.01.17	Zustand nach Billroth I-Operation; Akutes Nierenversagen; Ulcus ventriculi; Herz- und Kreislaufversagen.
KA	12	m	22.12.09	Essentielle Hypertonie mit benigner Nephrosklerose und Obergang in maligne Nephrosklerose; Tod im akuten Linksherzversagen.
KI	13	m	01.01.68	Schwere, chronische, destruierende, interstitielle Nephritis rechts; Zustand nach mehrmaliger Uretherolithotomie; Nephrektomie rechts.
KR	14	w	28.10.40	Pyelonephritische Schrumpfniere; chronisch rezidivierende Harnwegsinfekte mit Nierenbeteiligung; Nephrektomie rechts.

Tabelle 16 (Fortsetzung): Patienten und Diagnosen

Abkz.	Nr.	m/w	Geb.-Dat.	Diagnosen
LM	15	w	01.04.45	Mitralstenose; Aorteninsuffizienz; arterielle Hypertonie bei Schrumpfniere links; Nephrokalzinose beidseits; Nephrektomie.
MA	16	w	22.12.42	Hypertonie bei Schrumpfniere rechts; Nephrektomie rechts.
MF	17	m	05.07.01	Diabetes mellitus; Herzinfarkt; Magen-Darmblutung; Nierenversagen; Pneumonie.
MK	18	m	14.04.15	Unreifzelliges, multiples Myelom; schwere sekundäre Amyloidose; Herzversagen; akutes Nierenversagen.
MR	19	w	07.05.04	Akutes Nierenversagen bei akuter myeloischer Leukose.
NT	20	m	28.04.61	?
PG	21	w	03.04.37	Primäre maligne Nephrosklerose; Nephrektomie beidseits.
RW	22	m	09.02.25	Chronische Niereninsuffizienz; Zustand nach Nierentransplantation; schwere Abstoßungsreaktion; Transplantatniere.
SM	23	w	05.08.42	Schrumpfniere; Nephrektomie; Renal-parenchymatöse Hypertonie.
SAn	24	w	11.12.23	Akutes Nierenversagen; cerebrale Blutung.
SA	25	m	29.09.03	Generalisiertes Ig-G-Plasmozytom; Herz- und Kreislaufversagen; Zeichen des ANV.
SM	26	m	19.08.75	Rezidivierende Harnwegsinfekte; Nieren-PE; histologisch normales Nierengewebe; keine Refluxschäden.
TM	27	w	29.06.55	Verdacht auf gramnegative Sepsis; Verdacht auf Verbrauchskoagulopathie; eitrige Myokarditis; Tod im Herz-Kreislaufversagen; ANV.
WE	28	m	19.08.26	Alkoholische Leberzirrhose; Ösophagusvarizenblutung; Niereninsuffizienz; ANV; Verdacht auf Bronchialkarzinom.

Abkürzungen: m: männlich; w: weiblich; der erste Buchstabe von Familien- und Vorname dient der Kennzeichnung der Gewebeprobe.

Tabelle 17: Renin- und Proteingehalt der verarbeiteten Nierenproben

Niere Nr.	zona corticalis			zona corticomedullaris		
	/ug AI/g_{NG}·h	mg AI/g_{EW}·h	mg_{EW}/g_{NG}	/ug AI/g_{NG}·h	mg AI/g_{EW}·h	mg_{EW}/g_{NG}
1 norm.	45.1	2.7	16.7	117.1	6.9	17.0
1 schr.	133.8	6.2	21.4	229.7	10.8	21.3
2	60.9 ± 23.6	2.8 ± 0.2	19.0 ± 7.4			
2 (+)	266.6	18.7	14.3			
3	142.8 ± 59.0	4.6	22.1	168.8 ± 101.3	8.0	12.1
4	158.6	8.2	19.3			
5	9.6	1.2	7.7			
6	226.1 ± 4.0	13.4 ± 8.1	20.8 ± 12.9	176.8	6.3	28.1
7	126.1	12.7	9.9			
8	134.0 ± 27.2			29.7 ± 3.6		
9	220.1 ± 23.8	10.2 ± 6.1	25.3 ± 12.6			
10 li.	1034.4 ± 375.0	43.4	32.7	771.4 ± 244.1	12.6	47.7
10 re.	1615-2 ± 427.6	246.0	8.5	1113.4 ± 751.2	24.5	23.8
11	38.1			27.4		
12	14.3	0.7	20.4	8.7	1.0	8.7
13	115.7 ± 49.7	6.3	18.6	118.3 ± 79.8		
14	160.0	7.0	22.9	65.2	5.8	11.2
15	101.6	2.0	50.6	57.8	2.6	22.4
16	15.6 ± 5.8	0.6 ± 0.2	26.2 ± 1.3	14.7 ± 7.3	0.6 ± 0.4	19.1 ± 4.2

Tabelle 17 (Fortsetzung): Renin- und Proteingehalt der verarbeiteten Nierenproben

Niere Nr.	zona corticalis			zona corticomedullaris		
	/ug AI/g_{NG}·h	mg AI/g_{EW}·h	mg_{EW}/g_{NG}	/ug AI/g_{NG}·h	mg AI/g_{EW}·h	mg_{EW}/g_{NG}
17	25.5			23.1		
18	161.0 ± 96.9	1.3	36.2	184.8 ± 65.0		
19	50.4 ± 16.3	2.1 ± 1.2	50.6 ± 53.1	30.5 ± 19.5	2.7 ± 0.5	16.4 ± 5.9
20	123.2	4.2	29.4			
21 li.	233.7			201.8	1.1	186.9
21 re.	416.8	1.0	401.5	188.2	1.3	149.6
22	10.7	0.3	35.7	5.7	0.1	57.0
23	57.4			27.9		
24	19.0 ± 2.3	3.2	6.4	19.2 ± 0.4	2.5	7.8
25	55.7 ± 26.7			38.2 ± 1.5		
26	41.5	2.0	20.8			
27	125.9 ± 65.7	1.0 ± 0.3	131.1 ± 19.7	78.0 ± 38.8		
28	101.3	16.7	6.1	28.5	2.8	10.1

Mittelwerte (± SD)
norm.: "Normales" Nierengewebe
schr.: Schrumpfbezirk
li.: Linke Niere
re.: Rechte Niere
(+): Besonders auffälliger Wert.

Tabelle 18: Reninkonzentrationen und Proteinwerte in "normalem" Nierengewebe, bei akutem Nierenversagen, in Schrumpfnieren und bei maligner Nephrosklerose (Mittelwerte ± SD).

		zona corticalis		zona corticomedullaris	
Diagnose	Einheit	n		n	
"Normalwerte"	/ug AI/g_{NG}·h	9	50.5 ± 50.6	9	21.0 ± 10.2
	mg AI/g_{EW}·h	7	0.7 ± 0.7	6	0.4 ± 0.3
	mg_{EW}/g_{NG}	7	48.6 ± 14.6	6	45.3 ± 13.2
Akutes Nierenversagen	/ug AI/g_{NG}·h	29	81.2 ± 67.1	25	68.2 ± 70.0
	mg AI/g_{EW}·h	10	3.4 ± 4.8	5	2.4 ± 0.7
	mg_{EW}/g_{NG}	10	56.4 ± 56.2	5	22.3 ± 22.1
Schrumpfnieren	/ug AI/g_{NG}·h	13	82.8 ± 59.8	8	80.8 ± 79.0
	mg AI/g_{EW}·h	9	3.6 ± 3.2	5	4.1 ± 4.3
	mg_{EW}/g_{NG}	9	24.3 ± 11.5	5	18.6 ± 4.9
Maligne Nephrosklerose	/ug AI/g_{NG}·h	10	976.0 ± 633.5	7	612.2 ± 541.8
	mg AI/g_{EW}·h	4	75.8 ± 114.9	5	10.4 ± 9.7
	mg_{EW}/g_{NG}	4	113.2 ± 192.6	5	83.6 ± 79.6

3.8.3. Reninwerte bei besonderen Diagnosen

Um einen Bezug mit klinischer Relevanz zu gewinnen, wurden die Reninwerte bei akutem Nierenversagen (ANV), in Schrumpfnieren und bei maligner Nephrosklerose, zu denen jeweils mehrere Nieren vorlagen, mit den sogenannten Normalnieren verglichen (s. Tabelle 18, Seite 44).

Gegenüber den sogenannten Normalnieren waren die Reninwerte bei ANV in der Nierenrinde absolut 1 - 2fach, in zona corticomedullaris etwa dreifach erhöht ($p \leq 0.05$). Für die spezifische Reninkonzentration bestand dieser Unterschied zwischen beiden Nierenschichten nicht; beide Werte waren 5 - 6fach erhöht, aber nur für zona corticomedullaris signifikant ($p < 0.0005$). Der Proteingehalt der Nierenrinde war unverändert, in der Markzone leicht, aber signifikant ($p < 0.05$) erniedrigt.

Bei Schrumpfnieren war in zona corticalis eine leichte Erhöhung ($p \leq 0.1$) des absoluten Reningehaltes festzustellen; im Markbereich war er jedoch auf das Vierfache des Normalwertes stark ($p < 0.025$) erhöht. Dieses Verhalten beider zonae war bei jeweils stark erhöhten Reninkonzentrationen (zona corticalis: fünffach, $p < 0.025$; zona corticomedullaris: 10fach, $p < 0.05$) auch auf den Proteingehalt bezogen festzustellen, wobei dieser auf jeweils 50 % des Normalwertes hoch signifikant ($p < 0.0025$) vermindert war.

Für maligne Nephrosklerose wurden in beiden Schichten absolut und spezifisch sehr stark (20- bis 100fach) erhöhte Reninwerte gemessen. Es bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) zu den Reninkonzentrationen in den sogenannten Normalnieren, in Schrumpfnieren und denen bei ANV. Der Proteingehalt in Nierenrinde und -mark war dagegen gering erhöht ($p < 0.2$).

3.8.4. Schwankung der Reninverteilung im Nierengewebe

Die sogenannten Normalnieren hatten absolut in zona corticomedullaris mit 41.6 % der Reninkonzentration in der Nierenrinde signifikant ($p<0.05$) niedrigere Werte. Die spezifische Reninkonzentration im Markbereich betrug 55.7 % der in der äußeren Zone, der Unterschied war aber nicht signifikant ($p<0.2$).

Bei den unter Punkt 3.8.3. vorgestellten Krankheitsbildern wurden zwischen beiden Nierenschichten -bei erheblicher Streuung- keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen.

Für mehrfach bestimmte Nieren (z.B. Niere Nr.: 10 li., 10 re., 19, 27) schwankten die absoluten und die spezifischen Reninkonzentrationen innerhalb jeder Schicht stark zwischen 20 % und 70 % (Mittelwert: 42.4 %).

4. Diskussion

4.1. Radioimmunologische AI-Bestimmung

Da das Oktapeptid Angiotensin II selbst keine ausgeprägte Antigenität besitzt (22), muß man es an Polypeptide (Albumin oder Globuline) koppeln, um es radioimmunologisch bestimmen zu können. Dies wird aber durch die häufig benutzten Komplexbildner EDTA und BAL behindert, die nicht nur Angiotensinasen blockieren, sondern auch die Umwandlung von gebildetem AI in AII durch das Converting Enzyme vollständig unterbinden (15). Für eine direkte radioimmunologische Bestimmung kann das Reninmolekül derzeit noch nicht genügend rein dargestellt werden (Ausnahmen: 63, 69). Deshalb wird am besten ein RIA zur Messung der Reninaktivität benutzt, der die AI-Bildung aus der Reaktion zwischen Renin und Angiotensinogen in einem Inkubationsmedium mißt.

Nierengewebe wurde wie auch von BAGGIO et al. (2), GROSS und BARAJAS (41) und POULSEN und JØRGENSEN (83) so aufgearbeitet, daß die renale Reninaktivität mit einem kommerziellen Kit zur Messung der Plasmareninaktivität bestimmt werden konnte.

Unterschiedliche Proteinkonzentrationen in Standard- und Gewebeproben können trotz mancher gegenteiliger Ansicht (15, 20) die radioimmunologische AI-Bestimmung fehlerhaft werden lassen, da sie eine Abnahme der Antigen-Antikörper-Bindung und dadurch eine Erhöhung des ungebundenen Angiotensin I bewirken (9, 50). Diesen Fehler kann man nach MENARD und CATT (66) durch Hitzedenaturierung der Proteine verhindern. Da die ausgeflockten Proteine Angiotensin I unspezifisch adsorbieren können (79), wurden sie zusätzlich durch Säure denaturiert und zentrifugiert und der Proteinfehler damit beseitigt.

Wesentliche Voraussetzung eines Radioimmunoassay ist es, Standard- und unbekannte Proben in gleicher Weise zu behandeln (9, 50, 83). Um eine solche Äquilibrierung zu erreichen, wurde allen Proben im RIA, die nicht inkubiert wurden, der beschriebene Leerwert (s. 2.2.2., Seite 6) zugegeben. Das ersparte auch die routinemäßige Mitbestimmung von $4^{o}C$-aliquoten und reduzierte den Arbeits- und Materialaufwand. Es konnte gezeigt werden,

daß die Zugabe eines Nierenleerwertes eine systematisch bis 25 % zu hohe Reninbestimmung verhindert (s. 3.1.2., Seite 21).

Die zur Trennung von freiem und gebundenem Angiotensin benutzte Aktivkohle hat eine größere Affinität zum Angiotensin als der Antikörper (61, 91). Deshalb ist es für die Präzision der RIA-Bestimmung besonders wichtig, daß alle Proben der Kohlesuspension die gleiche Zeit ausgesetzt werden; eine Zeitdifferenz von fünf Minuten kann einen Fehler von 5 - 10 % verursachen (61). Ungenauigkeit beim Pipettieren der kleinen Flüssigkeitsvolumina ist ebenfalls ein wesentlicher Grund für geringe Präzision. HUMMERICH und KRAUSE (50) konnten solche Fehler durch Anwendung automatischer Pipettiermaschinen auf etwa 1 % reduzieren.

Wir fanden Variationskoeffizienten von 8.3 % für Doppelbestimmungen im gleichen RIA, 7.0 % für Proben, die in verschiedenen Ansätzen bestimmt wurden und 3.6 bis 10.2 % für Standardverdünnungen in verschiedenen RIA-Ansätzen; das entsprach einer guten, im üblichen Bereich für RIA-Methoden liegenden Intra- und Interassay-Variation (Siehe dazu: COHEN et al. 22, HAAS et al. 45, KOTCHEN et al. 55, MENARD und CATT 66, POULSEN und JØRGENSEN 83, SEALEY et al. 91 und WEBER et al. 106). Der Gebrauch des hochspezifischen Antikörpers (90) und die große Empfindlichkeit (Nachweisgrenze 20 pg AI) erlaubten bei guter Präzision eine reproduzierbare Angiotensin I-Bestimmung.

4.2. Gewebeaufarbeitung und Inkubation

Die Vermutung von ORTH et al. (79), daß sich aus dem ersten Sediment nach Zentrifugation des Nierenhomogenisates noch eine wesentliche Reninmenge extrahieren läßt, konnte für menschliches Nierengewebe bestätigt werden. Der Oberstand nach Zentrifugation des ersten Sedimentes lieferte nochmals bis zu 55.5 % der Reninkonzentration im vorangegangenen Sediment. Es zeigte sich dabei, daß die Resuspension des ersten Sedimentes mit anschließender Zentrifugation der Methode der Doppelhomogenisation oder der Inkubation des Gewebehomogenisates überlegen war. Da die Reninreaktion in vitro Temperatur-, pH-, und von der Elektrolytkonzentration abhängig ist (23, 24), wurden konstante Inkubationsbedingungen (pH 7.4, 37°C und Trispuffer 0.2M) festgelegt (48, 65).

Zur Bestimmung optimaler Reaktionsbedingungen im Inkubationsmedium sind enzymkinetische Untersuchungen, wie sie von vielen Autoren mit unterschiedlichen Renin-Substrat-Gemischen durchgeführt wurden (23, 24, 25, 32, 40, 62, 78, 79, 84, 97, 99, 100, 105) von entscheidender Bedeutung.

Der Substratgehalt im Inkubationspuffer wurde auf 35.0 mg/ml festgelegt; das entsprach dem 8 - 9fachen der mittleren Michaeliskonstante und gewährleistete für alle Bestimmungen einen Substratüberschuß, so daß die Reninreaktion nach einer Kinetik O-ter Ordnung verlief (52).

Bei Substratkonzentrationen über 40 mg/ml wurde eine non-MICHAELIS-MENTEN-Kinetik beobachtet, die einer Hemmung der Reninreaktion entsprach. Dieser Effekt beruhte nicht auf einer Produkthemmung durch Angiotensin I (47, 50), jedoch blieb die Möglichkeit der Produkthemmung durch den Substratmetaboliten Des-Angiotensin I-Angiotensinogen offen (4).

Die Affinität des Renin zum Schafsubstrat, gemessen an der Michaeliskonstante, war sehr uneinheitlich (60 % Streuung des Mittelwertes); dies kann sehr spekulativ als Hinweis auf verschiedene Reninmoleküle, wie sie einleitend beschrieben wurden, gedeutet werden.

Nach der von ROSENTHAL et al. (84) angegebenen Formel betrug die Reaktionsgeschwindigkeit im Inkubationsmedium zwischen 96.1 % und 82.4 % der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit. Da der niedrigste Wert bei einer Niere mit extrem hohen Reninkonzentrationen beobachtet wurde, wurde die Reproduzierbarkeit der Methode dadurch nicht beeinträchtigt.

Eine Steigerung der Reninaktivität durch Verdünnung der Renin-Substrat-Mischung wurde von einigen Autoren (23, 45, 65, 79) berichtet. OSMOND et al. (80) beschrieben jedoch eine Hemmung der Reninreaktion durch stärkere Verdünnung. Für verschiedene Nierenproben konnte eine deutliche Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (zunehmend mit der Gewebeverdünnung) von der inkubierten Gewebekonzentration nachgewiesen werden, die nicht auf einer ungenügenden Substratsättigung beruhte. In Teilbereichen beeinflußte die Gewebeverdünnung die Reninreaktion stärker

als die Substratkonzentration. Hier kann eine Aktivierung von Renin oder -vorstufen angenommen werden. Für Routinebestimmungen wurde eine Gewebekonzentration zwischen 0.7 mg/ml und 2.5 mg/ml festgelegt und auf Ausnahmen hingewiesen (s. Punkt 2.5.4, Seite 11).

Obwohl Nierengewebe eine sehr hohe Angiotensinasenaktivität besitzt (74), konnte die vollständige Blockierung der Angiotensinasen, des Converting Enzymes und bakterieller Aktivität durch eine 100 %ige Wiederfindung von Angiotensin I belegt werden. Sie erkärte sich durch die Verwendung der Hemmstoffe, die kurze Inkubationszeit (48), die starke Gewebeverdünnung (65, 79) und den physiologischen pH-Wert, bei dem ein Teil der Angiotensinasen inaktiv ist (6, 40, 79).

Nach der Inkubation wurden die Proben sofort auf pH 1.2 angesäuert und abgekocht. Dabei wurde das Renin-, Substrat- und Gewebeprotein denaturiert, so daß sich kein Niederschlag bilden konnte. Auf diese Weise wurde verhindert:

a) eine unkontrollierte Reninreaktion in der Abkühl-, bzw. Anwärmphase;
b) eine unspezifische Adsorption von Angiotensin I an ausgefällte Proteine (79);
c) ein Proteinfehler im Radioimmunoassay.

4.3. Vergleich zwischen Bioassay und Radioimmunoassay

Der Vergleich ergab mit $r = 0.856$ eine hoch signifikante ($p < 0.01$) Korrelation beider Methoden und durchschnittlich 3 - 5fach höhere radioimmunologisch gemessene Reninwerte.

KRITZINGER et al. (57) fanden dagegen keine ausreichende Übereinstimmung ($r = 0.69$) zwischen Bioassay und Radioimmunoassay. BOYD et al. (15) und COHEN et al. (22) bestimmten bei guter Korrelation (COHEN: $r = 0.91$) biologisch mehr Angiotensin als im RIA. HAAS und GOLDBLATT (43) erhielten radioimmunologisch bei fünf verschiedenen RIA-Techniken, die Angiotensin I als Standard verwendeten, durchschnittlich nur 42 % der biologischen Reninwerte. Zwei RIA-Methoden mit AII-Standard zeigten bei ihnen ca. 70 % der biologischen Werte. Etwa gleiche Reninwerte mit

beiden Methoden wurden von KOTCHEN et al. (55) für verschiedene Erkrankungen und Tierspezies gemessen, wobei die Korrelationskoeffizienten zwischen r = 0.79 und r = 0.97 schwankten. Höhere radioimmunologische Reninwerte fanden FLAMENBAUM und HAMBURGER (33) und SEALEY et al. (91). Bei letzteren war der Unterschied in seiner Größe vom verwendeten Standard (AI oder AII, in BIO und/oder RIA) abhängig. Beide Untersuchergruppen beobachteten hoch signifikante ($p < 0.01$, bzw. $p < 0.001$) Korrelationen.

Der Gebrauch unterschiedlicher Angiotensinstandards in beiden Methoden könnte Ursache der verschiedenen Ergebnisse sein: Die biologische Aktivität des Angiotensin I ist etwa 50 % bis 60 % von der des Angiotensin II (66, 78, 91), so daß die biologischen Werte entsprechend niedriger ausfallen müßten. ROSENTHAL et al. (84) konnten nachweisen, daß AII viermal schneller durch Angiotensinasen inaktiviert wurde als Angiotensin I, wodurch im Versuchstier ein Verlust an Pressoraktivität auftrat, der zu einer niedrigeren Bestimmung von Angiotensin II im Blutdruckversuch führen müßte. Dies stand in Übereinstimmung mit der relativ niedrigen Wiederfindung von Angiotensin II (60 % bis 85 %) in biologischen Systemen, wogegen sie bei RIA-Methoden mit 90 % bis 105 % (15, 22, 50, 66, 83, 91) angegeben wurde. Die hohe Wiederfindung erklärte sich im wesentlichen aus der Verwendung der Hemmstoffe beim Radioimmunoassay. EDTA, das zu einer vollständigen Hemmung des Converting Enzyms führt (22, 41, 74, 100), ist in biologischen Systemen nicht verwendbar. KOTCHEN et al. (55) und MENARD und CATT (66) führten höhere radioimmunologische Reninwerte auf durch Säuleneluation von Angiotensin I verursachte Angiotensinverluste bei der biologischen Methode nach BOUCHER et al. (12) zurück.

Falsch hohe radioimmunologische Reninwerte können durch unspezifische Antikörper hervorgerufen werden, die einen hohen unspezifischen Blank-Wert bewirken (57, 91). Lysozym, das Adsorptionsverluste von Angiotensin und Antikörper an Plastikgefäßen verhindern und die hochverdünnten Lösungen stabilisieren soll (6, 101, 105), kann durch proteolytische Aktivität einen Teil des Standard-Angiotensin I abbauen und zu falsch hohen RIA-Werten führen (101).

Die Differenzen beim vorliegenden Vergleich konnten damit zurückgeführt werden auf:

a) die Verwendung unterschiedlicher Angiotensinstandards,
b) Angiotensinverluste bei der biologischen Methode (Angiotensinasen und Dowexfehler),
c) zu niedrige biologische Bestimmungen auf Grund zu starker Gewebekonzentrationen im Substratansatz,
d) einen Lysozymfehler beim Radioimmunoassay.

Dennoch bestand zwischen beiden Methoden eine gute Übereinstimmung, bei ähnlicher Präzision und höherer Empfindlichkeit des RIA, mit dem auch eine größere Probenzahl in einem Ansatz bestimmt werden konnte.

4.4. Differentialzentrifugation

In der Literatur, die sich mit der subzellulären Lokalisation der Reninaktivität bei verschiedenen Tierspezies befaßte (21, 36, 71, 72), wurde übereinstimmend der größte Teil der absoluten Reninaktivität in der Fraktion der Zelltrümmer und im Überstand gefunden, der das lösliche Renin enthielt. In der Mitochondrienfraktion (5 % - 15 %) und in der Mikrosomenfraktion (1 % - 5 %), in denen Reningranula sedimentierten, fand sich wesentlich weniger Renin. Bei menschlichem Nierengewebe zeigte sich für die absolute Reninkonzentration eine ähnliche Verteilung (s. Tabelle 14, Seite 38).

NUSTAD und RUBIN (77), sowie SCHMID et al. (89) gaben den Hinweis, das Gewebe vorsichtig zu homogenisieren, da sonst durch Zerstörung der Reningranula ein großer Reninanteil von der Partikelfraktion (Mitochondrien und Mikrosomen) in die lösliche Phase überging. Für die absolute Reninkonzentration konnten wir, gemessen an der Veränderung des Reninanteils der Partikelfraktion zur löslichen Phase, keinen Unterschied zwischen schonender und vollständiger Homogenisation finden; die schonende Technik besaß jedoch eine vierfach höhere Präzision als die weniger schonende Methode.

Nach Differentialzentrifugation von Hunde- und Kaninchennieren wurden für absolute und spezifische Reninaktivitäten unterschiedliche subzelluläre Verteilungsmuster gefunden (71, 72). Dieses Verhalten konnte

für menschliches Nierengewebe bestätigt werden. In der Mikrosomenfraktion wurde der größte Teil (35.8 %) der spezifischen Reninkonzentration gemessen, die hier 18fach gegenüber der absoluten Reninkonzentration angereichert wurde.

Das subzelluläre Verteilungsmuster der spezifischen Reninaktivität im menschlichen Nierengewebe unterschied sich wesentlich von dem, das GANTEN (36) und MORIMOTO et al. (71, 72) für Hunde- und Kaninchennieren beschrieben haben. Ohne Berücksichtigung methodischer Unterschiede (frisches gegenüber tiefgefrorenem Nierengewebe, technische Details) wurde beobachtet, daß in der Mikrosomenfraktion menschliche Reningranula in fünffacher Menge gegenüber Reningranula aus Hundenieren (36, 72) und in doppelter Menge gegenüber Kaninchengranula (71) sedimentierten.

Für weitere Experimente konnten jedoch keine ausreichenden Mengen menschlicher Reningranula gewonnen werden, da die 12000 g- und 80000 g-Sedimente zu kleinvolumig waren. Hier können nur aufwendigere Techniken weiterhelfen, wie sie von GROSS und BARAJAS (41), SHEELER et al. (95) und WELLS et al. (108) beschrieben wurden.

4.5. Reninkonzentrationen bei verschiedenen Erkrankungen

Wie auch von HAYDUK (48) und MALL (65) wurden (in Zusammenarbeit mit SAUTER, 88) in histologisch unauffälligem Nierengewebe in der Nierenrinde signifikant etwa doppelt so hohe absolute Reninwerte wie in zona corticomedullaris gefunden. Bei akutem Nierenversagen, Schrumpfnieren und maligner Nephrosklerose ergaben sich diese Unterschiede nicht, was durch die nicht immer mögliche genaue Trennung beider Schichten in stark verändertem Nierengewebe mitverursacht wurde.

Der diagnostische Wert einmaliger Bestimmungen der Reninwerte wurde durch erhebliche regionale Schwankungen der Reninverteilung (s. Punkt 3.8.4., Seite 46) im Nierengewebe eingeschränkt, bei makroskopisch abgrenzbaren Strukturen war aber eine Reninbestimmung auch in Probeexzisaten möglich und sinnvoll. Auf eine ähnliche Problematik wurde von HAYDUK et al. (49) im Zusammenhang mit kleinen ischämischen Nieren-

bezirken hingewiesen, die eine renovaskuläre Hypertonie verursachen können.

Auf eine wesentliche Beteiligung des renalen Reninsystems an der Pathogenese des akuten Nierenversagens (7, 27, 37) deuten die erhöhten Reninwerte bei dieser Diagnose hin. Die Differenz zu den "Normalwerten" war aber nicht so groß wie bei HAYDUK (48) und MALL (65).

Entsprechend dem Parenchymverlust fand sich in Schrumpfnieren ein signifikant auf 50 % des Normalwertes gesenkter Proteingehalt, infolgedessen die spezifischen Reninwerte in beiden Nierenschichten erhöht waren, in zona corticomedullaris stärker als in der Rinde. Auch hier waren die relativen Veränderungen nicht so deutlich wie die von HAYDUK (48) beschriebenen.

Die extrem hohen Reninwerte (20 - 100fach) in Nieren mit maligner Nephrosklerose wurden ähnlich auch von MALL (65) und den bei ihm zitierten Autoren bestätigt. Die Erhöhung war für absolute und spezifische Reninkonzentration gleich stark, was auf eine chronisch gesteigerte Reninsynthese deutete (18, 37). Bemerkenswert ist, daß der Proteingehalt des Gewebes relativ gering verändert war.

5. Zusammenfassung

Es wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Renin im menschlichen Nierengewebe entwickelt. Das durch Renin von Angiotensinogen abgespaltene Angiotensin I wurde radioimmunologisch bestimmt.

Nierengewebeproben wurden unterschiedlich aufgearbeitet; wurde das primäre Sediment erneut homogenisiert und zentrifugiert, fanden sich darin 25.9 % der Reninmenge im primären Oberstand, wurde es nur resuspendiert, betrug der Anteil 55.5 %. Im Gewebehomogenisat ohne zusätzliche Zentrifugation wurde eine um 13.4 % niedrigere Reninkonzentration gemessen als in den vereinigten Oberständen. Ultraschallbehandlung des Gewebes konnte die Reninausbeute nicht steigern.

Die Geschwindigkeit der Renin-Reninsubstrat-Reaktion folgte einer Sättigungskinetik, da sie mit zunehmendem Substratgehalt im Inkubationsmedium stetig größer wurde, bis sie einen maximalen Wert (V_{max}) erreichte; bei Substratkonzentrationen über 40 mg/ml Inkubationsmedium nahm die Reaktionsgeschwindigkeit wieder ab.
Die Michaeliskonstante für die Reaktion von menschlichem Renin mit Schafsubstrat betrug 4.19 $\pm$ 2.50 mg/ml; daraus wurde ein optimaler Substratgehalt im Inkubationsmedium von 35.0 mg/ml abgeleitet.
Da zu hohe Nierengewebskonzentrationen im Substratansatz falsch niedrige Reninwerte verursachten, wurden die Bestimmungen bei Gewebekonzentrationen zwischen 0.7 mg/ml und 2.5 mg/ml durchgeführt.

Der Abbruch der Reninreaktion nach der Inkubation durch Ansäuern, Abkochen und anschließende Neutralisation ergab die höchsten Reninwerte. Wurde die Säure-Lauge-Behandlung unterlassen, so sank die gemessene Reninmenge um 6.8 %. Ansäuern und Neutralisieren allein lieferte um 12.6 % niedrigere Reninwerte als die erstgenannte Methode. Da bei 4°C 10.6 % der Angiotensinmenge nach Inkubation bei 37°C gemessen wurden, ließ sich durch einfaches Abkühlen der Proben nach der Inkubation keine zuverlässige Unterbrechung der Reninreaktion erreichen.

Die Streuung des RIA betrug für Doppelbestimmungen derselben Probe 8.3 %, für die Bestimmung in verschiedenen RIA-Ansätzen 7.0 %. Die

Nachweisgrenze lag bei 20 pg Angiotensin I. Ein Leerwert, der den Proben der Standardverdünnung als Gewebeäquivalent zugegeben wurde, verhinderte, daß die Reninwerte um 27.4 % zu hoch gemessen wurden. Mehrfachbestimmungen derselben Probe in verschiedenen Substratansätzen variierten um 8.0 $\pm$ 3.4 %, und die Wiederfindungsrate für die Inkubation von synthetischem Angiotensin I mit Nierengewebsextrakten betrug zwischen 98.6 $\pm$ 15.3 % und 101.7 $\pm$ 13.5 %.

Ein direkter Vergleich von Radioimmunoassay und Bioassay ergab eine hoch signifikante Obereinstimmung beider Methoden, wobei die radioimmunologisch gemessenen Reninwerte durchschnittlich vierfach höher waren als die mit der biologischen Technik gewonnenen.

Durch Differentialzentrifugation des Nierengewebes konnten unterschiedliche subzelluläre Verteilungsmuster für absolute und spezifische Reninkonzentrationen gewonnen werden. In der Mitochondrienfraktion fanden sich 8.4 % der absoluten und 16.2 % der spezifischen Reninkonzentration jeder Probe. Für die Mikrosomenfraktion betrug der Anteil der absoluten Reninkonzentration 2.0 %; dagegen konnte die spezifische Reninkonzentration hier auf 35.8 % angereichert werden.

Die Definition sogenannter Normalwerte für absolute und spezifische Reninkonzentration im menschlichen Nierengewebe ermöglichte die Beurteilung der Reninwerte bei verschiedenen Krankheitsbildern. Die Normalwerte betrugen in der Nierenrinde 50.5 $\pm$ 50.6 $/ug\ AI/g_{NG}\cdot h$, bzw. 0.7 $\pm$ 0.7 $mg\ AI/g_{EW}\cdot h$, im Nierenmark 21.0 $\pm$ 10.2 $/ug\ AI/g_{NG}\cdot h$, bzw. 0.4 $\pm$ 0.3 $mg\ AI/g_{EW}\cdot h$. Bei akutem Nierenversagen fanden sich in zona corticalis 81.2 $/ug\ AI/g_{NG}\cdot h$ und 3.4 $mg\ AI/g_{EW}\cdot h$, und in zona corticomedullaris 68.2 $/ug\ AI/g_{NG}\cdot h$ bzw. 2.4 $mg\ AI/g_{EW}\cdot h$. In zona corticalis von Schrumpfnieren wurden 82.8 $/ug\ AI/g_{NG}\cdot h$ bzw. 3.6 $mg\ AI/g_{EW}\cdot h$ gemessen, im Nierenmark 80.8 $/ug\ AI/g_{NG}\cdot h$ bzw. 4.1 $mg\ AI/g_{EW}\cdot h$. Die höchsten Reninwerte hatten Nieren mit der Diagnose maligne Nephroklerose; die Werte der absoluten Reninkonzentration betrugen dabei 976.0 $/ug\ AI/g_{NG}\cdot h$ in der Nierenrinde und 612.2 $/ug\ AI/g_{NG}\cdot h$ im Nierenmark. Auf den Proteingehalt bezogen errechneten sich 75.8 $mg\ AI/g_{EW}\cdot h$ (zona corticalis) und 10.4 $mg\ AI/g_{EW}\cdot h$ (zona corticomedullaris).

Literaturverzeichnis

1. AOI, W., M.B. WADE, D.R. ROSNER, and M.H. WEINBERGER: Renin release by rat kidney slices in vitro: effects of cations and catecholamines. Am. J. Physiol. 227 630-634 (1974).

2. BAGGIO, B., S. FAVARO, A. ANTONELLO, G. CANELLA, S. TODESCO, and A. BORSATTI: A possible role of the kidney in activating a renin preinhibitor. Res. Exp. Med. 166 201-207 (1975).

3. BARRET, J. D., P. EGGENA, and M. P. SAMBHI: Big big renin. Enzymatic and partial physical characterization of a new high molecular weight renin from normal human kidney. Circ. Res. 41 Suppl. II 7-11 (1977).

4. BARRET, J.D., P. EGGENA, and M.P. SAMBHI: Studies on the enzymatic behaviour of human renin in plasma. In: Mechanisms of hypertension, edited by M. P. SAMBHI. Amsterdam Excerpta Medica 223-231 (1973).

5. BASSO, N.: Enzyme-kinetics of the renin-angiotensin-system. Medicina (B. Aires) 32 Suppl. I 3-8 (1972).

6. BATH, N.M. and R.I. GREGERMAN: Labeled polymeric substrate for renin. Synthesis of N-acetyl-poly(L-glutamyl)-(125)tridecapeptide and use for enzyme assay. Biochemistry 11 2845-2853 (1972).

7. BEEVERS, D.G., J.J. BROWN, R. FRASER, A.F. LEVER, J.J. MORTON, J.I.S. ROBERTSON, P.F. SEMPLE, and M. TREE: The clinical value of renin and angiotensin estimations. Kidney int. 8 181-201 (1975).

8. BERSON, S.A., R.S. YALOW: Principles of immunoassay of peptide hormones. Clin. Endocr. 2 699-720 (1968).

9. BEYER, J.: Angiotensinogensynthese der isoliert perfundierten Rattenleber und ihre Veränderung bei experimenteller Leberschädigung. Dissertation, Würzburg (1975).

10. BOAZ, D., S. WYATT, and A. FITZ: Angiotensin I (Phe 8-His 9) hydrolase-studies with renin substrates. Biochem. Biophys. Res. Commun. 63 490-495 (1975).

11. BOUCHER, R., J. ASSELIN, and J. GENEST: A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin II. Circ. Res. 35 Suppl. I 203-209 (1974).

12. BOUCHER, R., J. MENARD, and J. GENEST: A micromethod for measurement of renin in the plasma and kidney of rats. Can. J. Physiol. Pharm. 45 881-890 (1967).

13. BOUCHER, R., M. SAIDI, and J. GENEST: A new angiotensin I converting enzyme system. In: GENEST, J. and E.KOIW: Hypertension'72, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 512-523 (1972).

14. BOYD, G.W.: A protein-bound form of porcine renal renin. Circ. Res. 35 426-438 (1974).

15. BOYD, G.W., A.R. ADAMSON, A. FITZ, and W.S. PEART: Radioimmunoassay determination of plasma-renin activity. Lancet I 213-218 (1969).

16. BOZOVIC, L. and S. EFFENDIC: Reninsecretion in vitro from rat kidney slices. 1. Influence of glucose on renin secretion. Acta endocrinol. 60 550-554 (1969).

17. BRAVO, E.L., M.C. KHOSLA, and F.M. BUMPUS: Effects of heptapeptide (2-8) analog on angiotensin-mediated aldosterone biosynthesis. J. Steroid. Biochem. 5 352-360 (1974).

18. CAIN, H. and B. KRAUS: The juxtaglomerular apparatus in malignant hypertension of man. Virchows Archiv (Pathol. Anat.) 372 11-28 (1976).

19. CAMPILLO, J.E., C.G. DEL RIO, T. QUESADA, and C.OSORIO: Simultaneous measurement of renin and substrate concentration in human plsama by a simple method. Clin. Chim. Acta 73 475-479 (1976).

20. CAVALLI-SFORZA, L.: Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. G.Fischer Verlag, Stuttgart (1972).

21. CHIANG, T.S., E.G. ERDÖS, I.MIWA, L.L. TAGUE, and J.J. COALSON: Isolation from a salivary gland of granules containig renin and kallikrein. Circ. Res. 23 507-517 (1968).

22. COHEN, E.L., C.E. GRIM, J.W. CONN, W.M. BLOUGH jr., R.B. GUYER, D.C. LUCAS: Accurate and rapid measurement of plasma renin activity by radioimmunoassay. J. Lab. Clin. Med. 77 1025-1038 (1971).

23. DAHLHEIM, H., P. WEBER und K. THURAU: Untersuchungen über die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Angiotensinbildung in vitro in Abhängigkeit von der elektrolytischen Zusammensetzung des Inkubationsmediums.. Pflügers Arch. 310 137-149 (1969).

24. DAHLHEIM, H., P. WEBER, P. WALTER und J. ROSENTHAL: Vergleichende reaktionskinetische Untersuchungen mit standardisiertem menschlichen Renin an vier angereicherten tierischen Reninsubstraten. Pflügers Arch. 317 344-358 (1970).

25. DAY, R.P. and J.A. LUETSCHER: Biochemical properties of big renin extracted from human plasma. J. Clin. Endocrinol. Metab. 40 1085-1093 (1975).

26. DAY, R.P., J.A. LUETSCHER, and C.M. GONZALES: Occurrence of big renin in human plasma, ammniotic fluid and kidney extracts. J. Clin. Endocrinol. Metab. 40 1078-1084 (1975).

27. DESAI, S.G., T.A. KOTCHEN, R.G. LUKE, and J.W. MCROBERTS: Reduction of renal renin content by hypothermic pulsatile perfusion. Transplantation 19 272-273 (1975).

28. DORNIER, A., J. GENEST, R. BOUCHER, W. NOWACZYNSKI, M. ROJO-ORTEGA, O. KUCHEL, and P. GRANGER: Effect of propanolol on plasma renin activity, renal cortex renin and adrenal brain isorenins in rats. Proc. Soc. Biol. Med. 150 521-524 (1975).

29. EGGENA, P., J.D. BARRETT, H. HIDAKA, C.L. CHU, C. THANANOPAVARN, M. S. GOLUB, and M.P. SAMBHI: A direct radioimmunoassay for human renin substrate and identification of multiple substrate types in plasma. Circ. Res. 41 Suppl. II 34-37 (1977).

30. EKINS, R.P.: The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. Clin. Chim. Acta 5 453-459 (1960).

31. FAVRE, L., R. ROUSSEL-DERUYCK, and M.B. VALLATTON: Influence of pH on human renin activity with different substrates; role of substrate denaturation. Biochim. Biophys. Acta 302 102-109 (1973).

32. FAVRE, L. and M.B. VALLATTON: Kinetics of the reaction of human renin with different natural substrates and tetradecapeptide substrate. Biochim. Biophys. Acta 327 471-480 (1973).

33. FLAMENBAUM, W., R.J. HAMBURGER (With the technical assistance of M. HUDDLESTON and L. TEMPLEMAN): Superficial and deep juxtaglomerular apparatus renin activity of the rat kidney. Effect of surgical preparation and NaCl intake. J. Clin. Invest. 54 1373-1381 (1974).

34. FUKUCHI, S.: Immunoassay for renin: measurement of renal renin content in autopsied hypertensive patients. Tohoku J. Exp. Med. 113 383-390 (1974).

35. GACHALYI, B., A. KALDOR, and K. KALLAY: Effect of propranolol on plasma renin level and angiotensin sensitivity in man. Int. J. Clin. Pharmacol. 13 196-198 (1976).

36. GANTEN, D.: Studies on the existence of an independent brain iso-renin-angiotensin system. A model for extrarenal tissue renin. Ph. D. Thesis, Department of Experimental Medicine, McGill Universitiy, Montreal, Canada (1972).

37. GAVRAS, H., J.A. OLIVER, and P.J. CANNON: Interrelations of renin, angiotensin II, and sodium in hypertension and renal failure. Annual Rev. Med. 27 485-521 (1976).

38. GOLDSTEIN, D.J., A. DIAZ, S. FINKIELMAN, V.E. NAHMOD, and C. FISCHER-FERRARO: Regulation of the in vitro synthesis of angiotensin I. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142 793-795 (1973).

39. GOODFRIEND, T.L. and M.J. PEACH: Angiotensin III: (Desaspartic acid^1) -angiotensin II. Evidence and speculation for its role as an important agonist in the renin-angiotensin system. Circ. Res. 36/37 Suppl. I 38-48 (1975).

40. GOULD, A.B., L.T. SKEGGS, and J.R. KAHN: Measurement of renin and substrate concentrations in human plasma. Lab. Invest. 15 1802-1813 (1966).

41. GROSS, D.M., and L. BARAJAS: The large-scale isolation of renin-containing granules from rabbit renal cortex by zonal centrifugation. J. Lab. Clin. Med. 85 467-477 (1975).

42. HAAS, E. and H. GOLDBLATT: Renin content of kidneys in experimental renal and human essential hypertension. Am. J. Physiol. 197 1103-1106 (1959).

43. HAAS, E. and H. GOLDBLATT: Indirect assay of plasma-renin. Lancet 1 1330-1332 (1972).

44. HAAS, E., H. GOLDBLATT, E.C. GIPSON, and L. LEWIS: Extraction, purification and assay of human renin free of angiotensinases. Circ. Res. 19 739-749 (1966).

45. HAAS, E., H. GOLDBLATT, L. LEWIS, and E.C. GIPSON: Studies on renin. I. Purification of dog renin and micromethod for the determination of renin in dog serum and tissues. Circ. Res. 31 65-73 (1972).

46. HABER, E., T. KOERNER, L.B. PAGE, B. KLIMAN, and A. PURNODE: Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiological measurements of plasma renin activity in normal human subjects. J. Clin. Endocr. 29 1349-1355 (1969).

47. HACKENTHAL, E., R. HACKENTHAL, and K.G. HOFBAUER: No evidence for product inhibition of the renin-angiotensinogen reaction in the rat. Circ. Res. 41 Suppl. II 49-54 (1977).

48. HAYDUK, K.:Plasmatisches und extraplasmatisches Renin. Ein Beitrag zur Bedeutung der Gewebsrenine. G. Thieme-Verlag, Stuttgart. Habilitationsschrift, Tübingen (1975).

49. HAYDUK, K., P. REIFFERSCHEID, G. KIENINGER, D. VÖLTER, and D. MEYER: Special patterns of renovascular hypertension. Contr. Nephrol. 3 160-166 (1976).

50. HUMMERICH, W. and D.K. KRAUSE: Improvement of renin determination in human plasma using a commonly available renin standard in a radioimmunological method. Klin. Wschr. 53 559-569 (1975).

51. IWAO, H., Y. ABE, and K. YAMAMOTO: Effect of intrarenal arterial infusion of calcium on renin release in dogs. Japan. J. Pharmacol. 24 482-484 (1974).

52. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie. G. Thieme Verlag, Stuttgart (8. Aufl.) (1972).

53. KOENIG, H., D. GAINES, T. MCDONALD, R. GRAY, and J. SCOTT: Studies on brain lysosomes: I-subcellular distribution of five acid hydrolases, succinate dehydrogenase and gangliosides in rat brain. J. Neurochem. 11 729-738 (1964).

54. KOKOT, F.: Über die Bedeutung des Renin in der Pathophysiologie und Diagnostik. Z. Ges. Inn. Med. 24 193-197 (1969).

55. KOTCHEN, T.A., W.A. FLAMENBAUM, W. CIRKSENA, and W. GAMBLE: Comparison of a biological and an immunological assay for the measurement of plasma renin activity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 36 804-810 (1973).

56. KRAUSE, D.K., K. HAYDUK, K.A. MEURER, D. GANTEN, R. BOUCHER, W. KAUFMANN und J. GENEST: Eine einfache, empfindliche Mikromethode zur Bestimmung der Plasma-Renin-Konzentration beim Menschen. Klin. Wschr. 50 833-840 (1972).

57. KRITZINGER, E.E., E. KANEGONI, and J.J. JONES: Plasma renin assay. Lancet 2 665 (1971).

58. LA GRANGE, R.G., C.H. SLOOP, and H.E. SCHMID: Selective stimulation of renal nerves in the anesthetized dog. Effect on renin release during controlled changes in renal hemodynamics. Circ. Res. 33 704-712 (1973).

59. LECKIE, B.: The activation of a possible zymogen of renin in rabbit kidney extracts. J. Endocrinol. 58 XXVI (1973).

60. LECKIE, B.J. and A. MC'CONNEL: A renin inhibitor from rabbit kidney. Conversation of a large inactive renin to a smaller active enzyme. Circ. Res. 36 513-519 (1975).

61. LEHFELDT, D.C. and T.T. HUTCHENS: A kinetic method for determination of plasma renin activity using radioassay of angiotensin I. Am. J. Clin. Pathol. 55 513-522 (1971).

62. LENTZ, K.E., L.T. SKEGGS, F.E. DORER, J.R. KAHN, and M. LEVINE: A new radiolabeled renin substrate. Anal. Biochem. 74 1-11 (1976).

63. LILIENFELD-TOAL, H.v., H. OCHS und L. WILDT: Prinzip und Anwendungsbereiche des Radioimmunoassay (V). Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Med. Welt, 27 320-322 (1976).

64. LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 265-275 (1951).

65. MALL, H.: Reningehalt menschlicher Nieren. Methodische Studien und Untersuchung spezieller Krankheitsbilder. Dissertation, Tübingen (1975).

66. MENARD, J. and K.J. CATT: Measurement of renin activity concentration and substrate in rat plasma by radioimmunoassay of angiotensin I. Endocrinol. 90 422-430 (1972).

67. MICHELAKIS, A.M.: The effect of sodium and calcium on renin release in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137 833-836 (1971).

68. MICHELAKIS, A.M., J. CAUDLE, and G.M. LIDDLE: In vitro stimulation of renin production by epinephrine, norepinehrine and cyclic AMP. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130 748-753 (1969).

69. MICHELAKIS, A.M., H. YOSHIDA, J. MENZIE, K. MURAKAMI, and T. INAGAMI: A radioimmunoassay for the direct measurement of renin in mice and its application to submaxillary gland and kidney studies. Endocrinol. 94 1101-1105 (1974).

70. MONTAGUE, D.: Kinetics of renin-angiotensinogen reaction in normal and nephrectomized rats. Am. J. Physiol. 215 78-83 (1968).

71. MORIMOTO, S., K. TANAKA, and R. KITANO: Distribution of renin in subcellular fractions from the rabbit kidney. Japan. J. Pharmacol. 25 295-301 (1975).

72. MORIMOTO, S., K. YAMAMOTO, and J. UEDA: Isolation of renin granules from the dog kidney cortex. J. Appl. Physiol. 33 306-311 (1972).

73. MORIMOTO, S., K. YAMAMOTO, K. HORIUCHI, H. TANAKA, and J. UEDA: A release of renin from dog kidney cortex slices. Japan. J. Pharmacol. 20 536-545 (1970).

74. MORRIS, B.J. and C.I. JOHNSTON: Renin substrate in granules from rat kidney cortex. Biochem. J. 154 625-637 (1976).

75. MOSS, A.J.jr., G.v. DALRYMPLE, and C.M. BOYD: Practical radioimmunoassay. The C.V. Mosby Company, Saint Louis (1976).

76. MURAKAMI, K., T. INAGAMI, and E. HAAS: Partial purification of human renin . Circ. Res. 41 Suppl. II 4-7 (1977).

77. NUSTAD, K. and I. RUBIN: Subcellular localization of renin and kininogenase in the rat kidney. Br. J. Pharmacol. 40 326-333 (1970).

78. ONTJES, D.A., J. MAJESTORAVICH jr., and J.C. ROBERTS: Radiochemical assay for renin utilizing a synthetic insoluble substrate. Anal. Biochem. 45 374-386 (1972).

79. ORTH, H., P. KRAHE, C. STEIGELMANN, and F. GROSS: An improved method for the determination of renin in rat kidneys. Pflügers Arch. 329 125-135 (1971).

80. OSMOND, D.H., P.A. MCFADZEAN, and K.D. SCAIFF: Renin activity by radioimmunoassay: The plasma incubation step. Clin. Biochem. 7 52-63 (1974).

81. PEART, W.S.: C. The renin-angiotensin system. A history and review of the renin-angiotensin system. Proc. Roy. Soc. (Biol.) 173 317-325 (1969).

82. POULSEN, K., E. HABER, and J. BURTON: On the specifity of human renin. Studies with peptide inhibitors. Biochem. Biophys.Acta 452 533-537 (1976).

83. POULSEN, K. and J. JØRGENSEN: An easy radioimmunological microassay of renin activity and substrate in human and animal plasma and tissues based on angiotensin I trapping by antibody. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39 816-825 (1974).

84. ROSENTHAL, J., H.P. WOLFF, P. WEBER, and H. DAHLHEIM: Enzyme kinetic studies on human renin and its purified homologous substrate. Am. J. Physiol. 221 1292-1296 (1971).

85. ROUFFIGNAC, C. de, J.P. BONVALET, and J. MENARD: Renin content in superficial and deep glomeruli of normal and salt-loaded rats. Am. J. Physiol. 226 150-154 (1974).

86. SAMBHI, M.P.: Renin-substrate reaction. An embarkation premise. Circ. Res. 41 Suppl.II 1-4 (1977).

87. SARUTA, T., K. KITAMOTO, F. HIGASHI, J. ARAI, and Y. OZAWA: Relationship between serum renin concentration, renal renin content and juxtaglomerular apparatus in hypertensive patients. Japan. Circ. J. 33 913-919 (1969).

88. SAUTER, M.: Dissertation in Vorbereitung.

89. SCHMID, D., R. TAUGNER, and C. DENEREAZ: Juxtaglomerular granules in subcellular fractions of guinea-pig kidney. Pflügers. Arch. 328 221-226 (1971).

90. SCHWARZ/MANN: Plasma renin activity radioimmunoassay kit (^{125}J). (Protocol for 400 tube kit). Division of Becton, Dickinson and Co., Mountain View Avenue, Orangeburg, New York 1062 (1976).

91. SEALEY, J.E., J. GERTEN-BANES, and J.H. LARAGH: The renin system: Variations in man measured by radioimmunoassay or bioassay. Kidney Int. 1 240-253 (1972).

92. SEALEY, J.E., C. MOON, J.H. LARAGH, and M. ALDERMAN: Plasma prorenin: Cryoactivation and relationship to renin substrate in normal subjects. Am. J. Med. 61 731-738 (1976).

93. SEALEY, J.E., R.P. WHITE, J.H. LARAGH, and A.L. RUBIN: Plasma prorenin and renin in anephric patients. Circ. Res. 41 Suppl. II 17-21 (1977).

94. SEMPLE, P.F., A.S. BOYD, P.M. DAWES, and J.J. MORTON: Angiotensin II and its heptapeptide (2-8), hexapeptide (3-8), and pentapeptide (4-8) metabolites in arterial and venous blood of man. Circ. Res. 39 671-678 (1976).

95. SHEELER, P., D.M. GROSS, and J.R. WELLS: Zonal centrifugation in reorienting density gradients. Biochim. Biophys. Acta 237 28-42 (1971).

96. SKEGGS, L.T., K.E. LENTZ, J.R. KAHN, and H. HOCHSTRASSER: Studies on the preparation and properties of renin. Circ. Res. 21 Suppl. II 91-100 (1967).

97. SKEGGS, L.T., K.E. LENTZ, J.R. KAHN, and H. HOCHSTRASSER: Kinetics of the reaction of renin with nine synthetic substrates. J. Exp. Med. 128 13-34 (1968).

98. SKEGGS, L.T., K.E. LENTZ, J.R. KAHN, M. LEVINE, and F.E. DORER: Multiple forms of human kidney renin. In GENEST, J. and E. KOIW: Hypertension'72. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 149-160 (1972).

99. SKINNER, S.L., J.R. DUNN, J. MAZZETTI, D.J. CAMPBELL, and N.H. FIDGE: Purification, properties and kinetics of sheep and human renin substrates. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53 77-88 (1975).

100. STOCKIGT, J.R., R.D. COLLINS, and E.G. BIGLIERI: Determination of plasma renin concentration by angiotensin I immunoassay. Circ. Res. 28 Suppl. II 175-189 (1971).

101. TEWKSBURY, D.A. and M.R. PREMEAU: The effect of proteolytic activity on plasma renin activity assay. Clin. Chim. Acta 73 67-70 (1976).

102. VANDONGEN, R. and W.S. PEART: The inhibition of renin by alpha-adrenergic stimulation in the isolated rat kidney. Clin. Sci. Mol. Med. 47 471-479 (1974).

103. VEYRAT, R. and E. ROSSET: In vitro renin release by human kidney slices : Effect of norepinephrine, angiotensin II and I, and aldosterone. In GENEST, J. and E. KOIW: Hypertension'72, Springer Verlag New York 44-54 (1972).

104. VITO, E. de, R.R.CABRERA, and J.C. FASCIOLO: Renin production and release by rat kidney slices. Am. J. Physiol. 219 1042-1045 (1970).

105. WALDHÄUSL, W. and J.A. LEWANDOWSKI: Measurement of plasma renin concentration (PRC) using exogenous substrate and radioimmunoassay. Europ. J. Clin. Invest. 3 1-9 (1973).

106. WEBER, P.C., J. BAUER, E. UHLICH, and F. SCHILDBERG: Kidney and plasma renin in human renovascular hypertension. Europ. J. Clin. Invest. 6 415-424 (1976).

107. WEINBERGER, M., W. AOI, and C. GRIM: Dynamic responses of active and inactive renin in normal and hypertensive humans. Circ. Res. 41 Suppl. II 21-25 (1977).

108. WELLS, J.R., P. SHEELER, and D.M. GROSS: A reorienting density gradient rotor for zonal centrifugation. Anal. Biochem. 46 7-18 (1972).

109. WHITTAKER, V.P.: The synaptosome. In LAJTHA, A.: Handbook of neurochemistry. Plenum Press, New York 2 327-330 (1969).

110. YALOW, R.S. and S.A. BERSON: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Invest. 39 1157-1175 (1960).

111. YAMAMOTO, K., H. IWAO, Y. ABE, and S. MORIMOTO: Effect of Ca on renin release in vitro and in vivo. Japan. Circ. J. 38 1127-1131 (1974).

Herzlich möchte ich mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. K. Hayduk für die Anregung zur Bearbeitung des Themas und seine freundlichen Bemühungen um das Gelingen der Arbeit,

Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. J. Beyer für seine wertvollen Ratschläge, seine ausdauernde Betreuung und seine stetige Bereitschaft, Probleme lösen zu helfen,

Herrn Prof. Dr. S. Heller für die Übernahme des Koreferates,

Frau V. Schönherr für die Durchführung der biologischen Reinbestimmungen und ihre bereitwillige Weitergabe praktischer Tips,

sowie allen, die mit Geräten, Material und Wissen zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben!

Lebenslauf

Am 13.April 1954 wurde ich, Berndt Manfred Wowra als Sohn des Günter Wowra und der Wilhelmine Wowra geb. Pechmann in Landsberg/Lech geboren. Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Oettingen/Bayern. Anschließend trat ich ins Gymnasium über. 1973 legte ich am humanistischen Zweig des Gymnasiums Neu-Ulm das allgemeine Abitur ab. Im Sommersemester 1974 immatrikulierte ich mich als Medizinstudent an der Universität Tübingen. Die Ärztliche Vorprüfung bestand ich 1976, den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung 1977, den zweiten 1980. Am 13.März 1980 heiratete ich die Chemiestudentin Monika Singhofer. Das medizinische Staatsexamen (dritter Teil der Ärztlichen Prüfung) bestand ich am 10.April 1981.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353